ZUR SYSTEMATIK UND STRUKTUR DER MUTTERKORNFARBSTOFFE

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
ELLEN-MARIE GOTTSCHALK
geb. Hrabowski
aus Göttingen

Göttingen 1964

Zur Systematik und Struktur der Mutterkornfarbstoffe

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt
von
Ellen-Marie Gottschalk
geb. Hrabowski
aus Göttingen

Göttingen 1964

Die vorliegende Arbeit wurde im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit vom 1. Juli 1961 bis zum 31. Juli 1963 ausgeführt.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. B. Franck für die Überlassung des Themas, für sein reges Interesse an dem Fortgang der Arbeit und für viele wertvolle Hinweise danken.

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

D 7
Referent: Professor Dr. B. Franck
Korreferent: Professor Dr. H. Brockmann
Tag der mündlichen Prüfung: 26.6.1964

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Einleitung und Problemstellung		1
Theoretischer Teil		3
I.	Isolierung und Charakterisierung der Mutterkornfarbstoffe	3
	1) Übersicht über die bisher beschriebenen Mutterkornfarbstoffe	3
	2) Die DRAGENDORFF'schen Farbstoffe	4
	3) Die Ergochrysinfarbstoffe	7
	a) Ergochrysin A	8
	b) Ergochrysin B	10
	c) Ergochrysin C	14
	4) Ergoxanthein	15
	5) Secalonsäure und Chrysergonsäure	16
	6) Extraktion des Mutterkorns unter Zusatz von Salzsäure	17
	7) Zusammenfassende Betrachtung aller bisher beschriebenen Mutterkornfarbstoffe	18
II.	Chromatographische Auftrennung der Secalonsäure, Isolierung und Charakterisierung der Komponenten	21
	1) Isolierung der Secalonsäuren A und B	21
	2) Charakterisierung von Secalonsäure A und B	22
III.	Oxydativer Abbau der Secalonsäuren A und B	29
IV.	Zur Konstitution der Secalonsäuren A und B	35
V.	Mengenverhältnis der Secalonsäuren A und B im Mutterkorn verschiedener Herkunft	42
Zusammenfassung		43

Beschreibung der Versuche

		Seite
I.	Die verwendeten Meßgeräte	45
II.	Chromatographische Methoden	45
III.	Aufarbeitung des Mutterkorns nach G.DRAGENDORFF und V.PODWISSOTZKY	47
	1) Gewinnung von Sclererythrin	47
	2) Chromatographische Auftrennung von Sclererythrin	48
	3) Abtrennung des Ergoflavins von den Ergochrysinen	48
	4) Isolierung von Scleroxanthein und Sclerocristallin	49
IV.	Die Ergochrysinfarbstoffe	49
	1) Isolierung der Ergochrysine	49
	2) Chromatographische Auftrennung der Ergochrysine	50
	3) Charakterisierung von Ergochrysin B	50
	4) Charakterisierung von Ergochrysin C	52
V.	Isolierung des Ergoxantheins, der Secalonsäure und der Chrysergonsäure	53
VI.	Saure Extraktion des Mutterkorns	54
VII.	Charakterisierung der Secalonsäuren A und B	55
	1) Präparative Gewinnung von Secalonsäure aus dem Mutterkorn	55
	2) Chromatographische Auftrennung der Secalonsäure	55
	3) Chemische und physikalische Eigenschaften der Komponenten SA und SB	56
VIII.	Oxydativer Abbau der Secalonsäuren A und B	58
	1) Ozonisierung von Secalonsäure A	58
	2) Auftrennung des Dicarbonsäuregemisches an Celite	58
	3) Isolierung der Abbau-Säuren 2 und 4	60
	4) Charakterisierung der Abbau-Säuren 2 und 4	60
	5) Ozonisierung von Secalonsäure B	62

Seite

IX. Komponentenverhältnis der Secalonsäure aus Mutterkorn verschiedener Herkunft 62

Literaturverzeichnis 63

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544311_0061

Einleitung und Problemstellung

Das auf Roggen und manchmal auch auf anderen Getreidearten überwinternde Dauermycel des schmarotzenden Ascomyceten Claviceps purpurea bezeichnet man als Mutterkorn. Seine große Giftigkeit ist seit dem Mittelalter bekannt. Sie war der Grund für die beim Verzehren unreinen Getreides oftmals auftretenden Erkrankungen der Bevölkerung ganzer Landstriche.

Bei richtiger Dosierung waren Mutterkornextrakte jedoch auch wichtige Helfer in der Medizin. Die therapeutisch wirksamen Bestandteile dieser Droge sind eine Reihe von Alkaloiden, die insbesondere von A. STOLL und Mitarbeitern [1] in ihrer Struktur aufgeklärt wurden. Eine andere Gruppe von Zellinhaltsstoffen gibt sich durch die Farbe des Mutterkorns zu erkennen. Zehn Farbstoffe sind bisher aus dem Mutterkorn isoliert worden. Erst zwei konnten in ihrer Struktur aufgeklärt werden. B. FRANCK und T. RESCHKE [2] zeigten, daß das Clavoxanthin identisch mit dem aus der Flechte Nephromopsis endocrocea isolierten Anthrachinonfarbstoff Endocrocin ist. [3] Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse konnte auch die Struktur des Ergoflavins ermittelt werden. Der gelbe Farbstoff erwies sich als Vertreter der bisher in der Natur noch nicht aufgefundenen Bixanthonyle. [4]

Die meisten Mutterkornfarbstoffe sind bereits vor mehreren Jahrzehnten isoliert worden. Da man zu dieser Zeit noch nicht über besonders leistungsfähige Methoden für die Auftrennung von Substanzgemischen verfügte, kam es zu Überschneidungen bei der Charakterisierung und Benennung der aus dem Mutterkorn isolierten Farbstofffraktionen. Deshalb erschien es angebracht, die Mutterkornfarbstoffe nach den in der Literatur beschriebenen Verfahren zu isolieren, sie mit chromatographischen Methoden zu vergleichen und auf ihre Einheitlichkeit hin zu überprüfen. Damit beschäftigt sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit.

Außerdem sollte durch oxydativen Abbau der Secalonsäure ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der Konstitution dieses Farbstoffes geliefert werden. Als erster isolierte im Jahre 1906 F. KRAFT [5] die Secalonsäure aus dem Mutterkorn. Durch A. STOLL [6] und B. FRANCK [7] wurden Untersuchungen über die Struktur dieser Verbindung unternommen. Die Ergebnisse ließen jedoch die Aufstellung einer Konstitutionsformel noch nicht zu.

THEORETISCHER TEIL

I. Isolierung und Charakterisierung der Mutterkornfarbstoffe

1) Übersicht über die bisher isolierten Mutterkornfarbstoffe

Die ersten Mutterkornfarbstoffe wurden im Jahre 1877 von G. DRAGENDORFF und V. PODWISSOTZKY [8] isoliert. Darunter befand sich auch das Sclerocristallin, der erste kristallisierte Mutterkornfarbstoff. In den folgenden Jahren wurden weitere Farbstoffe beschrieben (Tab. 1). Bei manchen von diesen war bisher nicht sichergestellt worden, ob sie sich von den von G. DRAGENDORFF und V. PODWISSOTZKY [8] abgetrennten Verbindungen unterscheiden.

Tab. 1: Zusammenstellung der in der Literatur beschriebenen Mutterkornfarbstoffe.

Farbstoff	Farbe	isoliert von	im Jahre
Sclererythrin	orange	G.DRAGENDORFF [8] V.PODWISSOTZKY	1877
Sclerocristallin	gelb	G.DRAGENDORFF V.PODWISSOTZKY	1877
Scleroxanthein	gelb	G.DRAGENDORFF V.PODWISSOTZKY	1877
Sclerojodin	violett	G.DRAGENDORFF V.PODWISSOTZKY	1877
Ergochrysin	gelb	C.JACOBY [11]	1897
Secalonsäure	gelb	F.KRAFT [5]	1906
Ergoxanthein	orange	W.T.WENZELL	1910
Ergoflavin	gelb	A.FREEBORN [10]	1912
Ergoflavin	gelb	A.W.FORST [14]	1926
Ergochrysin	gelb	G.BARGER [12] W.BERGMANN [13]	1932
Chrysergonsäure	hellgelb	A.STOLL [6]	1952
Endocrocin = Clavoxanthin	orange	B.FRANCK [2] T.RESCHKE	1959
Clavorubin	rot	B.FRANCK T.RESCHKE	1959

Im folgenden werden die nach den in der Literatur angegebenen Verfahren isolierten Farbstoffe auf ihre Einheitlichkeit hin untersucht und miteinander verglichen.

2) Die DRAGENDORFF'schen Farbstoffe

Für die Gewinnung des Sclererythrins wurde das Mutterkorn mit einem Weinsäure-Äthanol-Gemisch digeriert, der Extrakt eingedampft und mit Äther ausgeschüttelt. Aus der ätherischen Lösung fiel nach Zufügen der sechsfachen Menge Petroläther orangefarbenes Sclererythrin aus. Bei dieser Aufarbeitung des Mutterkorns sollte sich außerdem Sclerojodin als unlösliche Zwischenschicht bei der Ätherextraktion der wässrigen Phase abscheiden. Nach mehrtägigem Stehen der Lösung konnte eine braunviolette Substanz isoliert werden, doch stellte sich heraus, daß es sich hierbei um Mycelreste handelte, die mit Clavorubin angefärbt waren.
Um Scleroxanthin und Sclerocristallin zu isolieren, wurde das Mutterkorn nach der Behandlung mit dem Weinsäure-Äthanol-Gemisch mit Äther extrahiert. Die ersten drei Extrakte sollten in der Hauptsache Scleroxanthein, die anderen Sclerocristallin enthalten. G. DRAGENDORFF und V. PODWISSOTZKY [8] nahmen an, daß der erstgenannte Farbstoff das Hydrat des Sclerocristallins sei.
Um das Sclererythrin zu charakterisieren, wurde es papierchromatographisch in den Lösungsmittelsystemen tert.-Amylalkohol/Phosphatpuffer p_H=7, n-Butanol/Triäthylamin/Pyridin/Wasser (4:4:1:6) und Xylol/Eisessig/Wasser (10:9:1) untersucht. In allen drei Lösungsmittelsystemen wurde Sclererythrin in drei verschieden gefärbte Zonen, eine gelbe, eine orangefarbene und eine rote aufgetrennt. Zur Isolierung der einzelnen Farbstoffe wurde Sclererythrin an einer Zellulosepulversäule mit dem Lösungsmittelsystem n-Butanol/Phosphatpuffer p_H=7 chromatographiert, die Farbstoffzonen herausgeschnitten, gereinigt und mit den auf anderem Wege erhaltenen reinen Mutterkornfarbstoffen verglichen. (Abb.1)

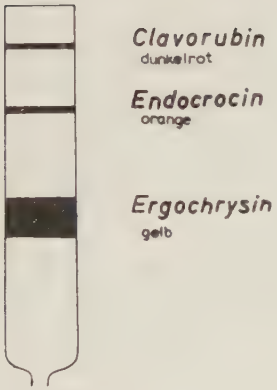
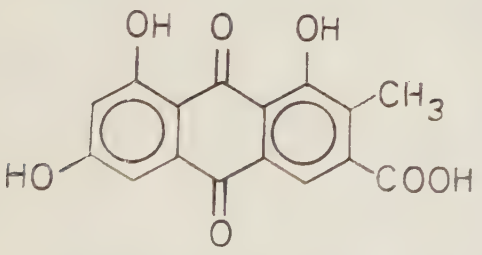


Abb. 1:
Auftrennung des Sclererythrins.

Im Papierchromatogramm war die orangefarbene Zone mit Endocrocin, die rote mit Clavorubin identisch. Auch die IR-Spektren der beiden Farbstoffe entsprachen denen des Endocrocins bzw. Clavorubins. Damit waren zwei Bestandteile des Sclererythrins identifiziert: Endocrocin, das von B. FRANCK und T. REISCHE [2] als 1,6,8-Trihydroxy-3-methyl-anthrachinon-carbonsäure(2)(I)



I

erkannt wurde, und das Clavorubin, dem ebenfalls die Struktur eines Anthrachinonfarbstoffes zugeschrieben wird. [9]

Im System n-Butanol/Phosphatpuffer p_H=7 hatte die gelbe Zone zwar den R_F-Wert des Ergoflavins [10], doch waren die IR-Spektren beider Verbindungen verschieden. Bei der Papierchromatographie im System Xylol/Eisessig/Wasser (10:9:1) zeigte sich, daß die gelbe Farbstoffzone aus mehreren Komponenten bestand. Sie trennte sich in drei gelbe Farbstoffe auf, von denen der mit der kleinsten Wanderungsgeschwindigkeit den gleichen R_F-Wert wie Ergoflavin hatte. Die Auftrennung des Farbstoffes durch Dünnschichtchromatographie mit Benzol/Methanol (19:1) als Elutionsmittel lieferte das gleiche Ergebnis. Die für Ergoflavin gehaltene Komponente wurde chromatographisch an einer Kieselgelsäule mit Benzol, dem steigende Mengen Aceton zugesetzt wurden, abgetrennt und mit vorhandenem Ergoflavin verglichen. Beide Substanzen stimmten in ihren Analysen, IR- und UV-Spektren überein. Die beiden anderen gelben Farbstoffe waren mit keinem der bisher aus dem Mutterkorn isolierten einheitlichen Farbstoffe identisch. Sie werden zusammen mit Ergoflavin als Ergochrysine bezeichnet und im nächsten Abschnitt dieser Arbeit genauer charakterisiert

Sclerexanthein und Sclerocristallin unterschieden sich in ihrem chromatographischen Verhalten und ihren UV- und IR-Spektren nicht. Beide Verbindungen waren in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften mit der Secalonsäure identisch.

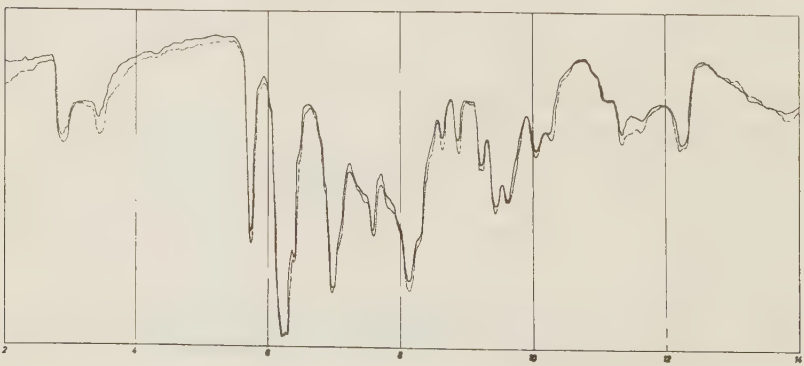
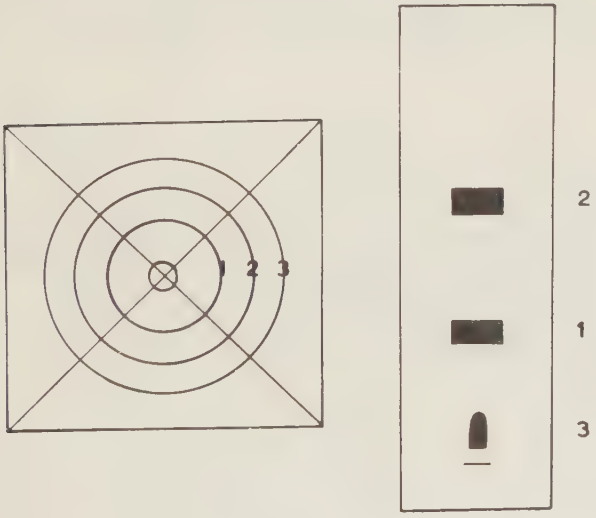


Abb. 2: IR-Spektren von Secalonsäure und Sclerocristallin in KBr

-·-·-·- Sclerocristallin
——— Secalonsäure

3) Die Ergochrysinfarbstoffe

Als Ergochrysin bezeichnete C. JACOBY [11] den gelben Farbstoff, den er mit Äther aus Mutterkorn extrahiert hatte. G. BARGER [12] und W. BERGMANN [13] gewannen Ergochrysin aus den braunen Farbstoffrückständen der Alkaloidextraktion und glaubten, daß Ergochrysin mit Secalonsäure identisch sei. Das nach beiden Methoden isolierte Ergochrysin wurde deshalb auf seine Einheitlichkeit hin untersucht und mit anderen Mutterkornfarbstoffen verglichen. Dabei zeigte sich, daß dieser Farbstoff aus mehreren Komponenten bestand. Sowohl im Papierchromatogramm (Xylol/Eisessig/Wasser = 10:9:1) als auch im Dünnschichtchromatogramm (Benzol/Methanol = 19:1) trennte sich Ergochrysin in 3 gelbe Farbstoffzonen auf (Abb.3).



a) Abb. 3 b)

Abb. 3: Auftrennung des Ergochrysins.
a) Papierchromatogramm
Xylol/Eisessig/Wasser = 10:9:1
b) Dünnschichtchromatogramm an neutralem Kieselgel G
Benzol/Methanol = 19:1
1=Ergochrysin A 2=Ergochrysin B 3=Ergochrysin C

Nach ihren R_F-Werten im Xylol/Eisessig/Wasser-System wurden sie als Ergochrysin A, Ergochrysin B und Ergochrysin C bezeichnet. Ihre Isolierung durch Säulenchromatographie an Cellulosepulver im oben genannten Lösungsmittelsystem bereitete Schwierigkeiten, weil sich die Farbstoffe während der Elution teilweise zersetzten. Deshalb wurde das Lösungsmittelsystem Benzol/Methanol (19:1), das sich bei der Dünnschichtchromatographie der Ergochrysine bereits bewährt hatte, für die präparative Auftrennung dieser Substanzen an Kieselgel G-Säulen verwendet.

a) Ergochrysin A

Von den drei Farbstoffzonen wurde Ergochrysin A, das den gleichen R_F-Wert wie Ergoflavin hatte, aus Äthanol umkristallisiert. Durch sein IR-Spektrum konnte es als Ergoflavin identifiziert werden (Abb. 4).

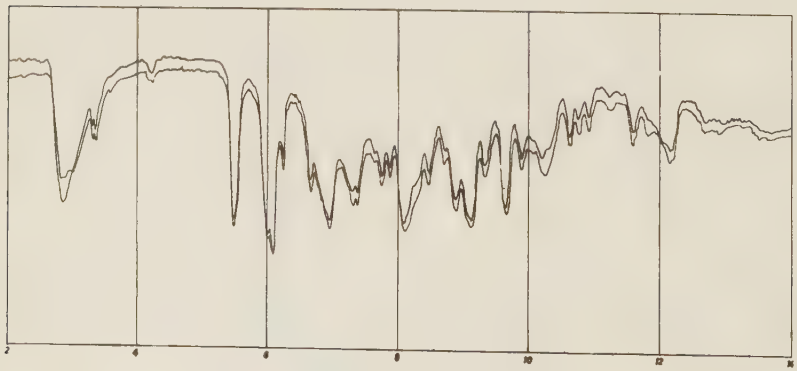
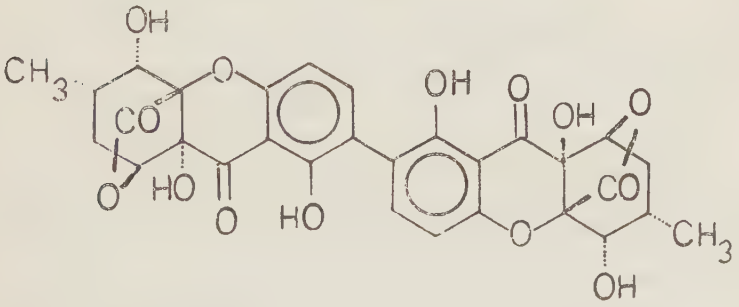


Abb. 4: IR-Spektrum von Ergoflavin in KBr.
——— Ergoflavin aus technischem Farbstoff
-·-·-·-· Ergoflavin aus Mutterkorn

Das in gelben Nadeln kristallisierende Ergoflavin war schon vor fünfzig Jahren von A. FREEBORN [10] aus Mutterkorn gewonnen worden. A.W. FORST [14], W. BERGMANN [13], A.ROBERTSON und Mitarbeiter [15], sowie B. FRANCK und J. AHRENS [16] isolierten Ergoflavin erneut und führten Strukturuntersuchungen durch. Eine endgültige Konstitutionsformel für das Ergoflavin konnte jedoch nicht aufgestellt werden. Der Hauptgrund hierfür mag darin liegen, daß es schwierig war, das Ergoflavin aus dem gelben Farbstoffgemisch, in dem es nur in geringer Konzentration vorhanden war, zu isolieren. So standen für die Untersuchungen immer nur ungenügende Substanzmengen zur Verfügung. Kürzlich konnten W.B. WHALLEY und Mitarbeiter [4] die Konstitution von Ergoflavin, das die Summenformel $C_{30}H_{26}O_{14}$ und ein Molekulargewicht von 610 hat, durch Röntgenstrukturanalyse ermitteln (II). Sie verwendeten hierzu das Tetra-O-methyl-ergoflavin-di-p-jodobenzoat.



II

Ergoflavin ist ein symmetrisch aufgebauter Farbstoff, der zwei γ-Lactonringe enthält. Es gehört zu den Bixanthonylen, deren erster in der Natur aufgefundener Vertreter es ist. Bisher wurde das Ergoflavin immer aus Farbstoffgemischen gewonnen, die bei der alkalischen Aufarbeitung des Mutterkorns auf Alkaloide in der Technik anfielen.

Um auszuschließen, daß es erst sekundär gebildet wurde, mußte geprüft werden, ob dieser Farbstoff sich auch aus nativem Mutterkorn isolieren läßt. Ergoflavinpräparate, die durch Ätherextraktion aus Mutterkorn und aus technischem Farbstoff isoliert wurden, waren miteinander identisch (Abb.4). Auch Ergochrysin B und C sind im nativen Mutterkorn enthalten.

b) Ergochrysin B

Ergochrysin B, von dem nur 30 mg (0,05 % Ausbeute) aus dem technischen Farbstoff abgetrennt werden konnten, war nach der Reinigung an Kieselgel papier- und dünnschichtchromatographisch einheitlich. Aus Benzol/Tetrachlorkohlenstoff schied sich Ergochrysin B in gelben Blättchen ab, die einen Schmelzpunkt von 291 °C und einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = + 100{,}2^\circ$ in Dioxan hatten. Wie das Ergoflavin gab diese Verbindung eine grüne Eisen-III-chlorid-Reaktion.

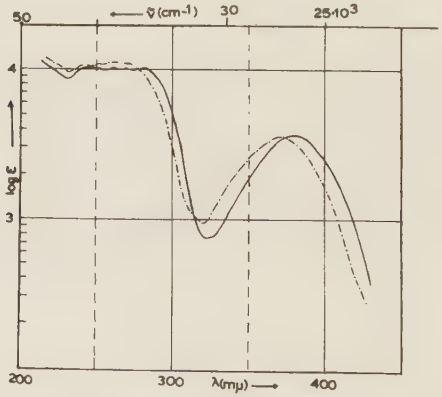


Abb. 5

Abb. 5: UV-Spektren des Ergochrysin B und des Ergoflavin in Methanol.

-·-·-·-·- Ergochrysin B
———— Ergoflavin

Auch das UV-Spektrum zeigte Ähnlichkeit mit dem des Ergoflavins, so daß es sich hierbei um eine mit diesem verwandte Verbindung handeln müßte.

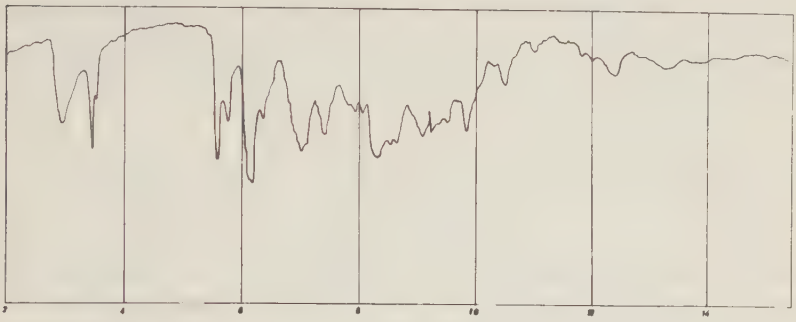


Abb. 6

Abb. 6: IR-Spektrum von Ergochrysin B in KBr.

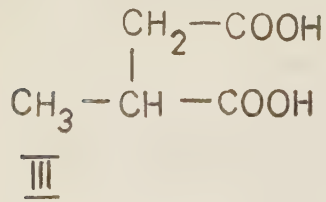
Die Bande bei 5,58 µ (1795/cm) im IR-Spektrum (Abb.6) entspricht der γ-Lactonbande des Ergoflavins; die Bande bei 5,76 µ (1738/cm) zusammen mit der Ätherbande bei 8,28 µ (1210/cm) deutet auf eine aliphatische Estergruppe hin. Hiermit steht auch in Einklang, daß im Ergochrysin B 5 % Methoxyl gefunden wurden. Ergoflavin enthält keine Estergruppierung. Für die Konstitutionsformel des Ergochrysin B bedeutet dieser Befund, daß hier wahrscheinlich einer der beiden γ-Lactonringe des Ergoflavins geöffnet und die so entstehende Säure verestert ist. Eine nur in diesem Punkt abweichende Struktur des Ergochrysin B würde die enge Verwandtschaft beider Verbindungen in ihren spektroskopischen Eigenschaften erklären.
Bei der potentiometrischen Titration verhielt sich Ergochrysin B wie eine einbasige Säure. Für das Molekulargewicht ergab die Titration einen Wert von 643. Ausgehend vom Methoxylwert des Ergochrysin B errechnete sich ein Molekulargewicht von 620. Diese Werte und die enge chemische Verwandtschaft

dieser Verbindung mit dem Ergoflavin sprechen für die Summenformel $C_{31}H_{28}O_{14}$ (M = 624,2). Auch die gefundenen Analysenwerte stimmten mit der angegebenen Summenformel annähernd überein. Diese unterscheidet sich von der des Ergoflavins ($C_{30}H_{26}O_{14}$) um CH_2. Danach ist im Ergochrysin B gegenüber Ergoflavin nicht nur die δ-Lactongruppe methanolytisch geöffnet, sondern es fehlt auch eine Hydroxygruppe.

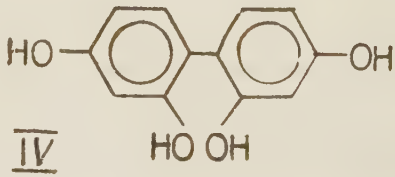
Tab. 2: Ergochrysin B

$C_{31}H_{28}O_{14}$ (624,2)	Ber.	C 59,60	H 4,52	OCH_3 4,97
	Gef.	C 59,49	H 4,52	OCH_3 5,06

Der energische Alkaliabbau des Ergochrysin B nach A.STOLL [6] ergab als Abbauprodukte 2,2',4,4'-Tetrahydroxydiphenyl (IV) und Methylbernsteinsäure (III).



III



IV

Die milde Alkalihydrolyse mit n Natronlauge wurde bei 20°C spektroskopisch verfolgt. (Abb.7) Dabei trat die gleiche

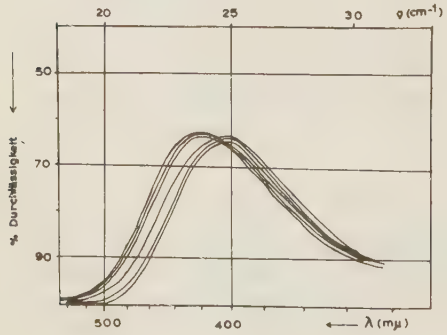
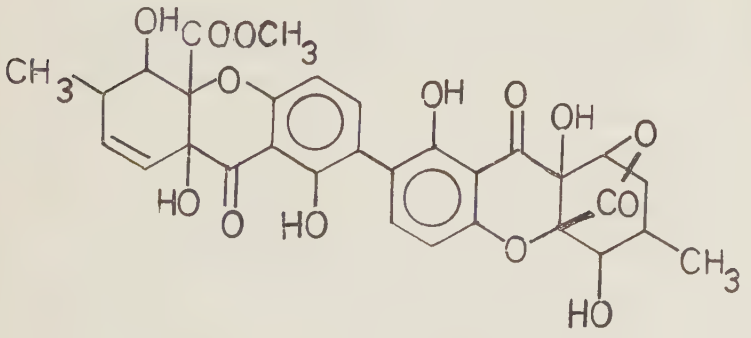


Abb. 7:
UV-Spektrum des Ergochrysin B in n Natronlauge bei 20°C nach 5 - 300 Min.

hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums ein, wie sie bei der Hydrolyse des Ergoflavins [16] beobachtet worden war; der charakteristische Verlauf des Spektrums blieb auch hier erhalten. Daraus mußte geschlossen werden, daß die Alkalihydrolyse im Molekül des Ergochrysin B keine größeren Veränderungen hervorgerufen hatte. Das isolierte Hydrolyseprodukt war methoxylfrei und zeigte ein vom Ergochrysin B verschiedenes IR-Spektrum. Die γ-Lactonbande bei 5,58 µ (1795/cm) war verschwunden. Die Bande bei 5,74 µ (1734/cm) konnte jetzt nicht mehr von einer Estergruppierung herrühren und wurde einer freien Carboxylgruppe zugeordnet. Das Hydrolyseprodukt des Ergoflavins, die Ergoflavinsäure, konnte durch A. ROBERTSON und Mitarbeiter [15] durch Kochen mit Eisessig wieder in die Ausgangsverbindung zurückverwandelt werden. Eine entsprechende Behandlung des Hydrolyseproduktes von Ergochrysin B führte zu keinem eindeutigen Ergebnis. Wegen Substanzmangels mußten die Untersuchungen an Ergochrysin B eingestellt werden.

Auf Grund der diskutierten Ergebnisse kann für Ergochrysin B folgender Konstitutionsvorschlag gemacht werden:



V

Die große Ähnlichkeit mit dem Ergoflavin läßt nur eine Struktur zu, die mit diesem nahe verwandt ist. Die Formel V berücksichtigt auch den einzigen größeren Unterschied zwischen den beiden Verbindungen: Das Vorhandensein einer Estergruppe

im Ergochrysin B. Kürzlich stellten W.B. WHALLEY und Mitarbeiter [7] eine Strukturformel für das nach der Methode von W. BERGMANN [3] isolierte Ergochrysin auf. Wie am Beginn dieses Abschnittes ausgeführt wurde, ist dieses Ergochrysin ein Farbstoffgemisch aus Ergoflavin und den Ergochrysinen B und C. Die Ergebnisse der genannten Autoren beziehen sich auf das chromatographisch nicht aufgetrennte Ergochrysin und können deshalb auch nicht mit den hier dargelegten übereinstimmen.

c) Ergochrysin C

Der dritte gelbe Farbstoff, der aus dem Ergochrysin isoliert wurde, ist der Hauptbestandteil dieser Farbstofffraktion; er wurde als Ergochrysin C bezeichnet. Die Substanz war nicht kristallisierbar und wanderte bei der Dünnschichtchromatographie an neutralem Kieselgel G als verwaschene Zone. Dagegen trennte sich Ergochrysin C an Kieselgel G, das mit 0,5 n Oxalsäure imprägniert war, in zwölf Komponenten auf (Abb.8).

Abb. 8:
Auftrennung des Ergochrysin C an oxalsaurem Kieselgel G mit Benzol/Methanol = 19:1.

Die Anzahl der Komponenten ließ sich durch Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin oder durch Methylierung mit Diazomethan nicht verringern.

Die Untersuchungen an Ergochrysin ergaben, daß die von C. JACOBY [10] und W. BERGMANN [12] isolierten Substanzen (s.Tabelle 1) identisch sind. Die Vermutung der Autoren, daß es sich hierbei um Secalonsäure handelte, konnte nicht bestätigt werden. Ergochrysin ist ein Farbstoffgemisch und besteht aus drei Hauptkomponenten, dem Ergoflavin und den Ergochrysinen B und C. Das bisher noch nicht bekannte Ergochrysin B konnte als einheitlicher Mutterkornfarbstoff charakterisiert werden. Ergochrysin C ist ein Gemisch von zwölf gelben Farbstoffen.

4) Ergoxanthein

Im Jahre 1910 isolierte W.T. WENZELL [18] das orangefarbene Ergoxanthein aus SQUIBBS Fluidextrakt [19], indem er diesen mit 95-proz. Äthanol behandelte. Nach dem Eindampfen der Lösung nahm er den Rückstand in Wasser auf und schüttelte mit Äther aus. Die ätherische Phase enthielt das Ergoxanthein, das beim Eindunsten des Äthers als amorph orangegelbe Substanz zurückblieb. Es lag nahe zu vermuten, daß im orangefarbenen Ergoxanthein das gleiche Farbstoffgemisch vorlag wie im Sclererythrin. Deshalb wurde es ebenso wie die DRAGENDORFF'schen Farbstoffe papierchromatographisch untersucht und an einer Cellulosepulversäule aufgetrennt. Dabei zeigte das Ergoxanthein eine orangefarbene und eine rote Zone, die als Endocrocin und Clavorubin identifiziert wurden. Eine weitere gelbe Zone bestand aus den drei Ergochrysinfarbstoffen. Am Kopf der Säule blieb ein gelber Farbstoff haften, der nach dem R_F-Wert im System n-Butanol/Triaethylamin/Pyridin/Wasser (4:4:1:6) und nach dem IR-Spektrum mit Secalonsäure übereinstimmte. Ergoxanthein war somit ein Farbstoffgemisch aller bisher isolierten Mutterkornfarbstoffe.

5) Secalonsäure und Chrysergonsäure

Erstmalig wurde kristallisierte Secalonsäure aus Mutterkorn vor fast 60 Jahren von F. KRAFT [5] isoliert. Auch G. DRAGENDORFF [8] hatte diesen Farbstoff aus Mutterkorn unter dem Namen Sclerocristallin abgetrennt, jedoch nur mangelhaft charakterisiert. A. STOLL, J. RENZ und A. BRACK [6] berichteten 1952 über die Isolierung von Secalonsäure aus ungarischem Mutterkorn. Aus schweizerischem Mutterkorn konnten sie keine Secalonsäure abtrennen. Sie fanden darin eine kristallisierte gelbe Säure, die sich von der Secalonsäure durch einen höheren Schmelzpunkt, geringere Löslichkeit, etwas höhere Kohlenstoffwerte und auch in der spezifischen Drehung in Pyridin unterschied. Diese gelbe Substanz aus dem schweizerischen Mutterkorn wurde "Chrysergonsäure" genannt.

Tab. 3: Eigenschaften der Secalonsäure und Chrysergonsäure nach Angaben aus der Literatur 5,8)

	Sclero-cristallin = Secalonsäure	Secalonsäure	Chrysergonsäure
Formel	$C_{10}H_{10}O_4$	$C_{14}H_{14}O_6$ $C_{31}H_{30-32}O_{14}$	$C_{32}H_{30-32}O_{14}$
Schmelzpunkt °C	?	244-250 (Chloroform) 260-262 (Aceton) 234-242 (Eisessig)	258-270 (Chloroform) 250-257 (Eisessig)
Kristallform	zitronengelbe Nadeln (Chloroform)	zitronengelbe Nadeln ($CHCl_3$) hellgelbe Prismen (Aceton) tiefgelbe Plättchen (Eisessig)	blaßgelbe Nadeln ($CHCl_3$) blaßgelbe Plättchen (Eisessig)
opt. Drehung $[\alpha]_D^{20}$		- 81° (Aceton) - 198° - -59° (Pyridin)	- 3° - + 34° (Pyridin)
Literatur	8	5;6	6

Zur Isolierung der beiden Farbstoffe wurde frisch gemahlenes Mutterkorn möglichst einheitlicher genetischer Herkunft verwendet, das durch künstliche Beimpfung von Roggen gewonnen worden war.

Die Secalonsäure wurde nach der Vorschrift von F. KRAFT [5] aus entfettetem Mutterkorn durch Chloroformextraktion gewonnen, die Lösung eingedampft und der ölige Rückstand mit Petroläther zu einem graugrünen Pulver entfettet. Dieses behandelte man mit Eisessig zur Entfernung von Alkaloiden und mit wenig heißem Methanol zur Beseitigung restlicher Fette. Aus Chloroform kristallisierte die Secalonsäure in feinen gelben Nadeln, die bei 256-258°C schmolzen.

Durch Behandeln von Mutterkorn mit 80-proz. Methanol nach der Vorschrift von A. STOLL und Mitarbeitern [6] wurde die Chrysergonsäure gewonnen. Die Hauptmenge des Methanols wurde abgedampft, die wässrige Lösung mit Salzsäure angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt. Dabei schied sich eine graugelb gefärbte Substanz ab, die sich aus Äther/Dioxan zu gelben Plättchen umkristallisieren ließ.

Von diesen Secalonsäure- und Chrysergonsäure-Präparaten wurden die IR-Spektren und Analysen verglichen. Es zeigte sich, daß die gelben Stoffe miteinander identisch waren. Somit konnte aus dem deutschen Mutterkorn durch die von A. STOLL für Chrysergonsäure angegebene Vorschrift keine von der Secalonsäure verschiedene Verbindung isoliert werden. [7]

6) Extraktion des Mutterkorns mit Salzsäure

Bei der Abtrennung der Secalonsäure aus dem Mutterkorn war beobachtet worden, daß sich die Ausbeute an dieser Substanz durch vorherige Extraktion des Mutterkorns mit 10-proz. Weinsäure und Äthanol erhöhen ließ. Wahrscheinlich wurde dadurch das Mycel besser aufgeschlossen oder glykosidisch gebundener Farbstoff in Freiheit gesetzt. Um nun die optimalen Bedingungen für die Farbstoffisolierung zu finden, wurden die Sclerotien unter Erwärmen mit 2 n und 6n Salzsäure

[illegible] Äthanol, mit Eisessig, sowie mit Dioxan, in dem [illegible] gelöst waren, behandelt. Nach dem Abfiltrieren des Mutterkorns wurden die Lösungen neutralisiert und papierchromatographisch in verschiedenen Lösungsmittelsystemen untersucht. Es traten nur die bekannten Farbstoffzonen des Endocrocin, Clavorubin und der Ergochrysine auf. Secalonsäure fand sich nur in dem salzsauren Dioxan. Eine Erhöhung der Farbstoffausbeute durch Behandlung des Mutterkorns mit wässriger oder wasserfreier Mineralsäure konnte somit nicht erreicht werden.

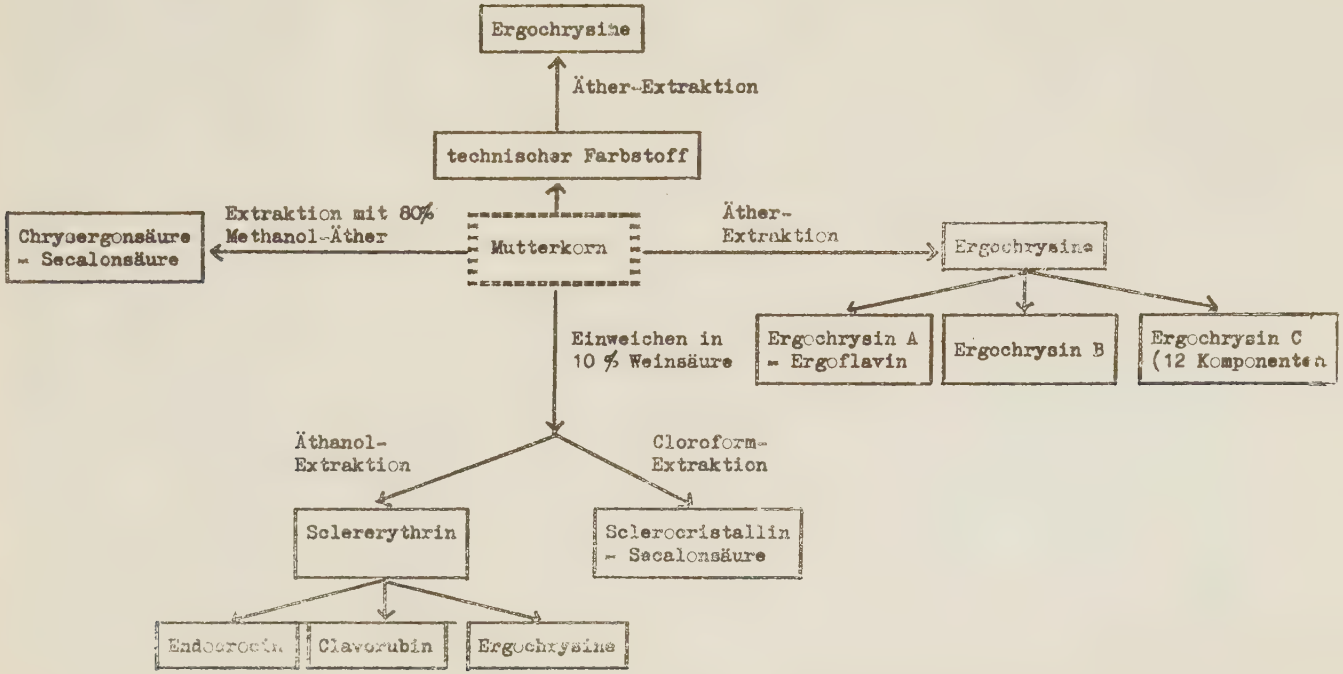
7) Zusammenfassende Betrachtung aller bisher beschriebenen Mutterkornfarbstoffe

Die meisten Mutterkornfarbstoffe wurden zu einer Zeit isoliert, in der man die empfindlichen chromatographischen Methoden zur Auftrennung von Substanzgemischen noch nicht kannte. Daher handelte es sich bei diesen Präparaten teilweise um Gemische ähnlicher Zusammensetzung. Die Mutterkornfarbstoffe können heute auf Grund ihres Chromophors in zwei Gruppen - die Anthrachinon- und Bixanthonylfarbstoffe eingeteilt werden. Zu den Anthrachinonfarbstoffen gehören das von B. FRANCK und T. RESCHKE [2] isolierte und in seiner Struktur aufgeklärte orangefarbene Endocrocin und das dunkelrote Clavorubin [9]. Die gelben Farbstoffe haben einen Bixanthonylchromophor, der zum ersten Male beim Ergoflavin durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen werden konnte. Im Ergoflavin sind die beiden Xanthonringe in 6,6'-Stellung verknüpft; der Farbstoff enthält zwei γ-Lactonringe und keine aliphatische Estergruppe. In der Secalonsäure sind die Xanthonringe in 8,8'-Stellung verbunden. Die Verbindung reagiert deshalb nicht mit 2,6-Dibrombenzochinon-chlorimid (GIBBS - Reaktion [20]). Die Secalonsäure enthält in ihrem Molekül keine γ-Lactongruppierung, aber zwei aliphatische Estergruppen. Ergochrysin B nimmt eine Mittelstellung zwischen Ergoflavin und Secalonsäure ein. In seinem Molekül sind sowohl eine aliphatische Estergruppe als auch ein γ-Lactonring enthalten.

Nach den chromatographischen Versuchsergebnissen sind das orangefarbene Sclererythrin und Ergoxanthein Substanzgemische verschiedenfarbiger Komponenten. Sie enthalten Endocrocin, Clavorubin und die Ergochrysine. Aus Ergoxanthein kann auch eine geringe Menge Secalonsäure isoliert werden. Ergochrysin ist ein Gemisch der gelben Farbstoffe Ergoflavin, Ergochrysin B und Ergochrysin C. Die Gewinnung und Charakterisierung der einzelnen Mutterkornfarbstoffe ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tab. 4:

Übersicht über die Mutterkornfarbstoffe



II. Chromatographische Auftrennung der Secalonsäure und Charakterisierung der Komponenten

1) Isolierung der Secalonsäuren A und B

Die Charakterisierung der Secalonsäure wurde bisher durch Papierchromatographie im Lösungsmittelsystem n-Butanol/Triaethylamin/Pyridin/Wasser (4:4:1:6) durchgeführt [7]. Bei der Auftrennung der Ergochrysine hatte sich die Dünnschichtchromatographie nun besonders bewährt. Deshalb sollte auch die Secalonsäure in dieser Weise getestet werden. An neutralem Kieselgel mit und ohne Gipszusatz führten Chromatographieversuche zu keinem Erfolg. Wie Ergochrysin C wanderte die Secalonsäure dort mit starker Schwanzbildung. Erst bei Verwendung von Kieselgel G, das mit 0,5 n Oxalsäure imprägniert war, wurden mit Benzol/Methanol (19:1) scharfe Zonen erhalten (Abb. 9).

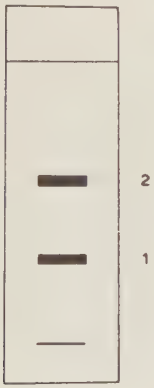


Abb. 9:
Auftrennung der Secalonsäure an oxalsaurem Kieselgel G mit Benzol/Methanol = 19:1.
1 = Secalonsäure A
2 = Secalonsäure B

Überraschend war das Ergebnis, daß sich die bisher als einheitlicher Farbstoff angesehene kristallisierte Secalonsäure in zwei gelbe Farbstoffzonen auftrennte. Sie hatten einen R_F-Wert von 0,3 und 0,58 und werden in dieser Arbeit als S A und S B bezeichnet.

Für die präparative Auftrennung der Secalonsäure war das Benzol/Methanol-Lösungsmittelsystem nicht geeignet, da das Methanol durch Herauslösen von Oxalsäure eine Abnahme der Acidität des Kieselgels G bewirkte. Es mußte deshalb ein unpolares Lösungsmittelsystem gesucht werden. Die besten Trennungen wurden mit Chloroform/Methyl-n-propylketon (9:1) erreicht.

Nach der säulenchromatographischen Auftrennung der Secalongäure wurden die Lösungen der Farbstoffe S A und S B mit Wasser neutral gewaschen, eingedampft und die Rückstände jeweils dreimal aus Chloroform umkristallisiert. S B war leichter löslich in Chloroform als S A und kristallisierte in zitronengelben Nadeln vom Schmelzpunkt 254 - 256°C. S A wurde in Form von hellgelben seidigen Nadeln (Schmelzpunkt 246 - 247°C) erhalten. Beide Farbstoffe gaben in Methanol eine rote Eisen-III-chlorid-Reaktion und unterschieden sich in ihrer optischen Aktivität. Die spezifische Drehung in Dioxan war für S A $[\alpha]_d^{20} = -83{,}8^\circ$ und für S B $[\alpha]_d^{20} = +195{,}8^\circ$.

Sowohl A. STOLL und Mitarbeiter [6] als auch B. FRANCK und Mitarbeiter [7] hatten beobachtet, daß sich die spezifische Drehung der Secalonsäure in Pyridin über längere Zeit hin verändert (Tab. 3). Wurden nun S A und S B in Pyridin stehengelassen, so trat innerhalb von drei Wochen keine Änderung des Drehwertes auf. Die Prüfung der Substanzen durch Dünnschichtchromatographie zeigte, daß sich S A und S B nach etwa einer Woche zu zersetzen begannen. Die früher beobachtete Änderung der spezifischen Drehung des Secalonsäuregemisches ist möglicherweise auf Unterschiede im Feuchtigkeitsgehalt des Pyridins zurückzuführen.

2) Charakterisierung von S A und S B

Es wurde bereits erwähnt, daß A. STOLL und Mitarbeiter [6] aus schweizerischem Mutterkorn eine gelbe Substanz - die Chrysergonsäure - isoliert hatten, die in vielen Eigenschaften mit der Secalonsäure übereinstimmte, sich in einigen anderen jedoch deutlich von dieser unterschied (Tab. 3).

Die Autoren gaben als Summenformel für Secalonsäure $C_{31}H_{30-32}O_{14}$ und für Chrysergonsäure $C_{32}H_{30-32}O_{14}$ an. Auch bei den Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalten der Secalonsäure S A und S B konnten Unterschiede gefunden werden (Tab. 5); für S A wurde auf Grund der Analysenwerte die Formel $C_{32}H_{30}O_{14}$ aufgestellt. Für S B lagen die Kohlenstoff- und Wasserstoffwerte niedriger, so daß die Verbindung mehr Sauerstoff enthalten mußte. Die Formel $C_{32}H_{30}O_{15}$ würde den gefundenen Analysenwerten am besten gerecht. Ob dieser Unterschied in den Summenformeln von S A und S B richtig ist, konnte allein durch die Kohlenstoff/Wasserstoff-Analysen nicht entschieden werden. Allerdings ließen es die Analysen auch nicht zu, S A und S B als Isomere zu betrachten. Dazu müßten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Die Analysen zeigten, daß beide Verbindungen offensichtlich die gleiche Anzahl von Kohlenstoff- und Wasserstoffatomen im Molekül enthielten und sich so in ihrer Struktur weitgehend gleichen mußten.

Tab. 5: Analysenwerte der Secalonsäuren A und B

Secalonsäure A					
$C_{32}H_{30}O_{14}$ (638)	Ber.	C 60,19	H 4,74	O 35,07	
	Gef.	C 59,79	H 4,74		
		C 60,04	H 4,74	O 34,23	
Secalonsäure B					
$C_{32}H_{30}O_{15}$ (654)	Ber.	C 58,72	H 4,59	O 37,63	
	Gef.	C 58,63	H 4,45		
		C 58,65	H 4,64		
		C 58,98	H 4,53	O 36,75	
		C 58,52	H 4,59		

Die Secalonsäuren A und B enthielten je zwei Methoxylgruppen und C-Methylgruppen. In Essigester gelöst waren beide Substanzen mit Wasserstoff in Gegenwart von Platin-Katalysatoren nicht hydrierbar und hatten also keine unter diesen Bedingungen hydrierbare Doppelbindungen.

Die Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin und Methylierung mit Diazomethan führte bei S A zu amorphen Produkten, die sich im Dünnschichtchromatogramm in mehrere Zonen auftrennten (Abb. 10). Die Versuche wurden deshalb in dieser Richtung nicht fortgeführt.

Abb. 10:

a) Auftrennung des Methylderivates von Secalonsäure A an oxalsaurem Kieselgel G mit Benzol/Methanol = 17:3. Die Zonen 5 und 6 waren nicht anfärbbar mit diazotierter Sulfanilsäure, sie fluoreszierten im UV-Licht blau.

b) Auftrennung des Secalonsäure A-Acetates an neutralem Kieselgel G mit Chloroform/Methanol = 9:1. Die Zonen fluoreszierten im UV-Licht blau.

Bei der potentiometrischen Titration, die wegen der geringen Wasser- und Alkohollöslichkeit beider Verbindungen in 80-proz. wäserigem Dimethylformamid durchgeführt wurde, ließen sich für S A und S B je zwei saure Gruppen nachweisen. Der pK-Wert betrug für S A 8,6 und für S B 9,1. Die Acidität beider Substanzen lag so zwischen der von Benzoesäure (pK_{DMF} = 7,6) und 2,6-Dihydroxyacetophenon (pK_{DMF} = 10,2). Keine der beiden Secalonsäuren ließ sich mit methanolischer Salzsäure verestern. So mußte die Acidität der Secalonsäuren von phenolischen oder enolischen Hydroxylgruppen herrühren.

Der alkalische Abbau der beiden Secalonsäuren wurde nach A. STOLL [6] durchgeführt. Für beide Verbindungen konnten die gleichen Abbauprodukte 2,2',4,4'-Tetrahydroxydiphenyl, Methylbernsteinsäure und Bernsteinsäure durch zweidimensionale Papier-

chromatographie nachgewiesen werden. A. STOLL hatte diese beiden Abbauprodukte bei der Secalonsäure und der Chrysergonsäure erhalten. Außer in ihren Abbauprodukten stimmen die beiden Secalonsäuren auch im Chromophor überein. Das wurde durch den gleichartigen Verlauf der UV-Spektren beider Verbindungen bestätigt (Abb.11).

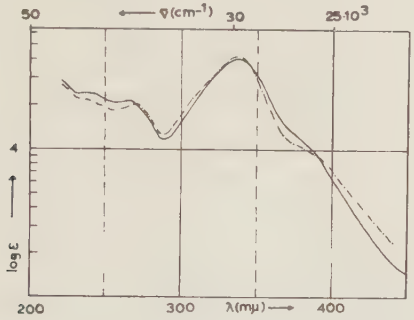


Abb. 11: UV-Spektren der Secalonsäuren A und B in Dioxan.
-·-·-·- Secalonsäure A
———— Secalonsäure B

Das Absorptionsmaximum von S A lag bei 338 mμ (ε= 41023), das von S B bei 339 mμ (ε= 40221); S A zeigte bei 270 mμ und S B bei 264 mμ ein flaches Maximum. Zur weiteren Charakterisierung der Secalonsäuren S A und S B wurden ihre IR-Spektren analysiert und miteinander verglichen. Die Spektren zeigten im Carbonylbereich gleichen Verlauf (Abb.12).

Die in beiden Spektren vorhandene Bande bei 5,76 μ (1735/cm) war für eine freie aromatische oder aliphatische Carboxylgruppe zu kurzwellig. Sie wurde zusammen mit der Ätherbande bei 8,1 μ (1235/cm) einer aliphatischen Estergruppe zugeordnet. Damit stehen die bereits erwähnten Befunde im Einklang, daß der saure Charakter der Secalonsäure von enolischen oder phenolischen Hydroxylgruppen aber nicht von freien Carboxylgruppen herrührt.

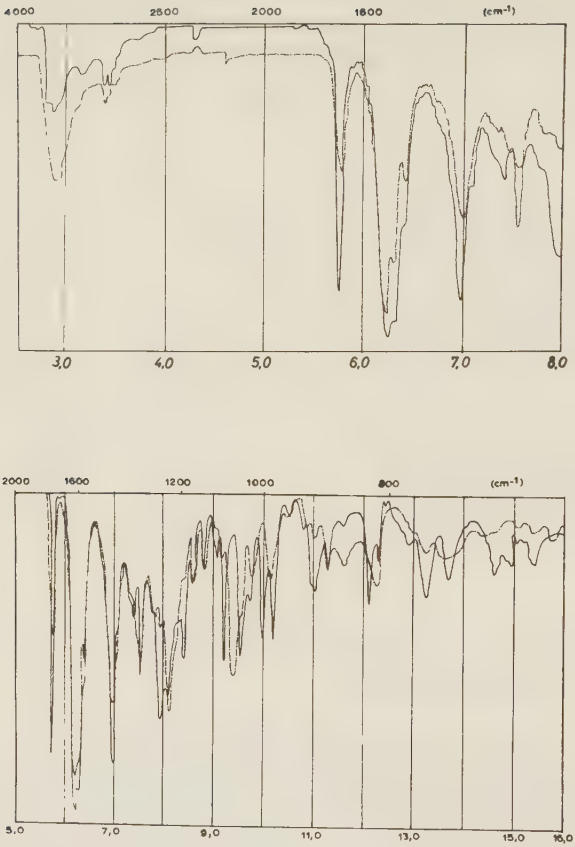


Abb. 12: IR-Spektren der Secalonsäuren A und B in KBr.
-°-·-·-· Secalonsäure A
———— Secalonsäure B

Die in Pyridin aufgenommenen PMR-Spektren (Abb. 13/14) zeigten bei 3,79 für S A und bei 3,78 und 3,89 für S B die Methoxylsignale gesättigter Carbonsäureester. Die Ester ungesättigter Carbonsäuren geben erst unter 3,75 Methoxylsignale, so daß sich in Nachbarschaft der Carbomethoxygruppe

Jede Secalonsäure keine Doppelbindungen befinden könnte. Das PMR-Spektrum von S A zeigte als Methoxylsignal einen schmalen Peak. Das sprach dafür, daß in S A beide Carbomethoxygruppen gleichartig angeordnet sein mußten.

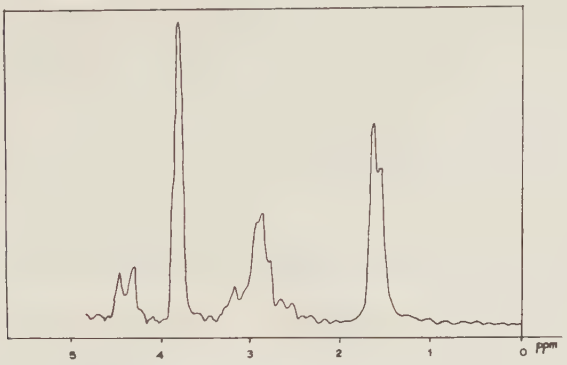


Abb. 13: PMR-Spektrum von Secalonsäure A in Pyridin

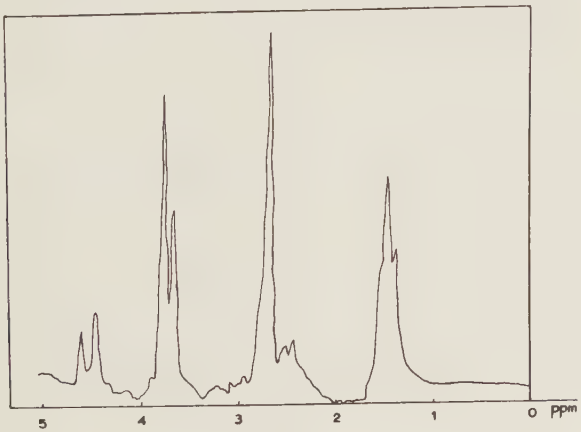


Abb. 14: PMR-Spektrum von Secalonsäure B in Pyridin

Im PMR-Spektrum von S B dagegen ist das Methoxylsignal aufgespalten. Das kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, daß die Carbomethoxygruppen einander nicht äquivalent sind. Eine ähnliche Aufspaltung des Methoxylsignals beobachteten R.U. LEMIEUX und Mitarbeiter [21] bei Dimethoxycyclohexanderivaten, wenn eine Methoxylgruppe axial und die andere äquatorial angeordnet war. Eine solche unsymmetrische Stellung könnte daher auch für die Carbomethoxygruppen in S B angenommen werden.

Tab. 6: Eigenschaften der Secalonsäuren A und B.

	Secalonsäure A	Secalonsäure B
Schmelzpunkt °C	246 - 247	254 - 256
$[\alpha]_D^{20}$ Pyridin	+ 176,8	+ 194,4
$[\alpha]_D^{20}$ Dioxan	- 83,5	+ 195,8
R_F-Wert	0,30	0,58
λ max.	338 mμ (ε = 41023)	339 mμ (ε = 40221)

III. Oxydativer Abbau der Secalonsäuren A und B

Bei der Alkalischmelze nach A. STOLL [6] lieferten Secalonsäure A und B als Abbauprodukte 2,2',4,4'-Tetrahydroxybiphenyl, Methylbernsteinsäure und Bernsteinsäure. B. FRANCK und Mitarbeiter [2] hatten für das Secalonsäuregemisch die gleichen Spaltprodukte erhalten. Um Aufschluß über die Art der Verknüpfung dieser Molekülbruchstücke zu bekommen, führten sie einen schrittweisen Alkaliabbau durch. Dieser zeigte, daß zuerst ein 2,6-Dihydroxy-acetophenon-System freigelegt, dann Methylbernsteinsäure und Tetrahydroxy-biphenyl abgespalten wurden. Im Vergleich hierzu sollte nun die Secalonsäure mit Ozon oxydativ abgebaut werden. Durch die Kenntnis der dabei entstehenden Spaltprodukte war ein weiterer Einblick in die Struktur dieser Verbindung zu erhoffen.

Vor der Ozonisierung wurde die Secalonsäure säulenchromatographisch in Secalonsäure A und B aufgetrennt. Da hierbei Secalonsäure A in größeren Mengen als Secalonsäure B isoliert werden konnte, wurden die Versuche mit Secalonsäure A begonnen. Zur Ozonisierung wurde Secalonsäure A in Essigester gelöst und bei 0°C mit einem 7-proz. Ozon/Sauerstoff-Strom etwa 12 Std lang bis zur hellblauen Färbung der Lösung behandelt. Nach der Spaltung der Ozonide wurde die Lösung zu einem Sirup eingedampft. Bei der papierchromatographischen Untersuchung zeigte sich, daß dieser sechs Dicarbonsäuren enthielt: Oxalsäure (R_F= 0,00 - 0,18), Methylbernsteinsäure (R_F= 0,37) und vier Säuren mit höherem R_f-Wert als Methylbernsteinsäure.

Die präparative Auftrennung der Dicarbonsäuren erfolgte an Celite,+) das mit 0,2n Schwefelsäure imprägniert war. Mit 100 ml Chloroform, dem steigende Mengen Butanol zugesetzt waren, entwickelte man die Säule. Die aufgefangenen Fraktionen wurden mit 0,01n Natronlauge titriert.

+) Celite 535 Serva Entwicklungslabor Heidelberg

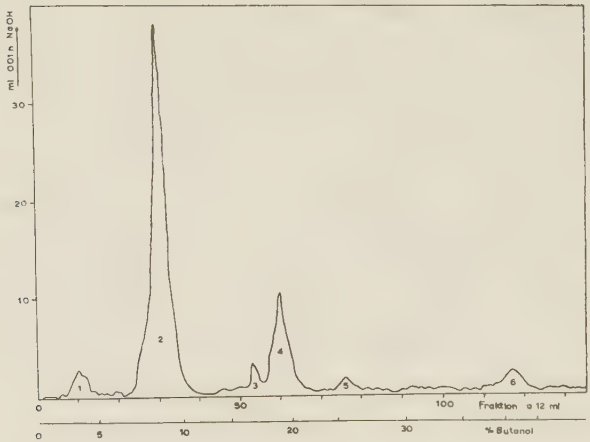


Abb. 15: Auftrennung des Dicarbonsäuregemisches, das beim Ozonabbau von Secalonsäure A entstanden war, an Celite.

In Abb. 15 ist der Verbrauch von Natronlauge gegen die Anzahl der Fraktionen aufgetragen worden. Wie im Papierchromatogramm ließen sich auch auf diesem Wege sechs Dicarbonsäuren nachweisen. Mit 5-proz. Butanolzusatz wurde die Hauptmenge (68%) des Säuregemisches eluiert (Fraktion 2). Die Säure hatte einen R_F-Wert von 0,57. Bei ihrer Isolierung zeigte sich, daß sie labil war, denn schon nach kurzer Zeit konnte im Papierchromatogramm zusätzlich eine langsam wandernde Säurezone beobachtet werden. Um die Säure völlig umzuwandeln, wurde eine Probe mit 0,2 n Schwefelsäure und eine zweite mit 0,1n Natronlauge erhitzt. Beide Ansätze wurden papierchromatographisch untersucht. Nach der Säurebehandlung war die Verbindung vom R_F-Wert von 0,57 verschwunden. Sie hatte sich vollständig in die Zone mit dem kleineren R_F-Wert (0,44) umgewandelt. Bei der Alkalibehandlung wurde die Säure vorwiegend zu Methylbernsteinsäure (R_F-Wert 0,37) abgebaut.

Durch Mineralsäuren ließ sich also die bei der Ozonidspaltung entstehende instabile Säure in eine stabile Dicarbonsäure umwandeln. Um diese von vornherein zu erhalten, wurde das bei der Ozonisierung gewonnene Reaktionsgemisch nach der Zersetzung der Ozonide noch 5 Std. mit 0,2n Schwefelsäure unter Rückfluß gekocht, die saure Lösung anschließend mit Essigester extrahiert und der Essigesterauszug mit festem Bariumcarbonat neutralisiert. Die Auftrennung des Säuregemisches an Celite [22] wurde wiederum durch Titration mit Natronlauge verfolgt (Abb.16). Die zuvor mit Chloroform/5-proz. Butanol eluierte Säure (Abb.15) war verschwunden.

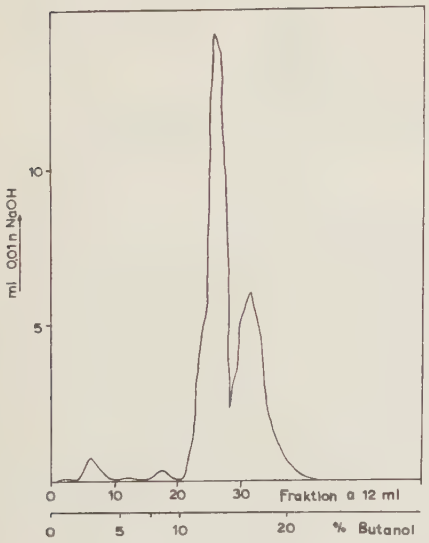


Abb. 16:
Auftrennung des Dicarbonsäuregemisches, das beim Ozonabbau der Secalonsäure A nach der Behandlung mit 0,2n Schwefelsäure erhalten worden war, an Celite.

Dafür ließ sich bei Zusatz von 10-proz. Butanol eine andere Dicarbonsäure gewinnen. Im Papierchromatogramm wanderte sie als scharfe Zone. Die Säure war hygroskopisch und konnte nur als Natriumsalz isoliert werden [23]. Im IR-Spektrum zeigte dieses eine breite Hydroxylbande bei 2,9 μ, wie sie bei α-Hydroxysäuren beobachtet wird.

Nach [illegible] [24] können α-Hydroxysäuren durch Reaktion [illegible]säure nachgewiesen werden. Dabei zeigt die Bildung eines gelben Niederschlages von Silberjodat die Anwesenheit einer α-Hydroxygruppe an. Diese Reaktion war bei der [illegible]säure positiv. Unter gleichen Bedingungen gaben [illegible] Milchsäure und Äpfelsäure auch Fällungen von Silberjodat, während bei β-Hydroxypropionsäure, Fumarsäure, β-Hydroxy-β-methylglutarsäure und Brenztraubensäure keine Trübung der Lösung auftrat. Nach der Analyse des Natriumsalzes dieser Verbindung mußte es sich hierbei um eine C-6-Dicarbonsäure mit einer α-Hydroxygruppe handeln.

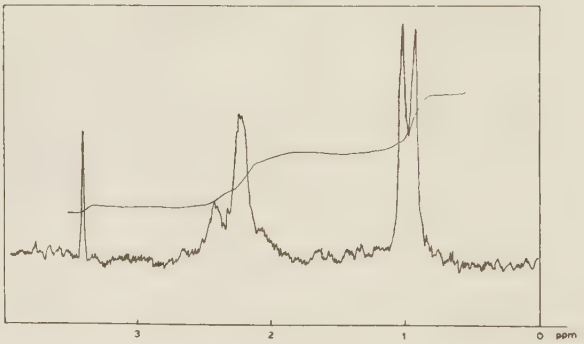
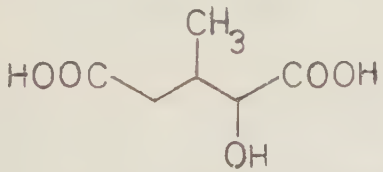


Abb. 17: PMR-Spektrum des Natriumsalzes der α-Hydroxy-ß-methylglutarsäure in D_2O.

Das PMR-Spektrum dieses Natriumsalzes in D_2O (Abb.17) zeigte bei 0,95 ein Dublett (J=6 Hz), dessen Fläche drei Protonen und damit einer $>HC-CH_3$-Gruppe entsprach. Danach mußte es sich bei der isolierten Verbindung um eine Glutarsäure mit einer α-Hydroxy- und einer ß- oder γ-ständigen Methylgruppe handeln. Auf Grund der Lage der Methylenprotonen bei 2,25 mußten diese in α-Stellung zu einer CO_2^--Gruppe und die Methylgruppe demnach in ß-Stellung angeordnet sein. Die Signale entsprechender Protonen im Propionamid oder im Methylbernsteinsäuredimethylester wurden im selben Bereich

bei 2,2 bzw. 2,67 ($CDCl_3$) gefunden. Würde die Methylengruppe in dieser Säure in ß-Stellung stehen, dann müßte ihr Signal stärker aufgespalten und zu niedrigeren Frequenzen verschoben sein. Die Methinbande bei 2,48 gehört ihrer Lage nach zu dem tertiären Proton, das zusammen mit der Methylgruppe am ß-C-Atom der α-Hydroxy-ß-methylglutarsäure haftet. Das Signal des Protons der >CH-OH-Gruppe wird von der Wasserlinie bei 3,42 verdeckt. Das gleiche beobachtete man auch bei der α-Hydroxypropionsäure (Milchsäure), wo das OH-Signal bei 3,4 auftrat.
Von den möglichen C_6-α-Hydroxydicarbonsäuren erfüllte nur die α-Hydroxy-ß-methylglutarsäure (VI) die Aussagen des PMR-Spektrums (Abb. 17).



VI

Die zweite Dicarbonsäure, die sich mit Chloroform/10-proz. Butanol eluieren ließ, hatte im zweidimensionalen Papierchromatogramm den gleichen R_F-Wert wie synthetische Methylbernsteinsäure. Nach der Sublimation im Hochvakuum entsprachen ihre Analysenwerte den für Methylbernsteinsäure berechneten. Die Substanz schmolz bei 105 - 106°C. Dieser Schmelzpunkt wurde von L.A.DUNCANSON [25] für die d-Form der Methylbernsteinsäure angegeben. Das Racemat der Verbindung schmilzt bei 110-111°C. Die Bestimmung der spezifischen Drehung in Methanol, die einen Wert von $[\alpha]_D^{26} = 10,9^c$ ergab, bestätigte, daß es sich bei der isolierten Verbindung um rechtsdrehende Methylbernsteinsäure (R-Konfiguration [26]) handelte.

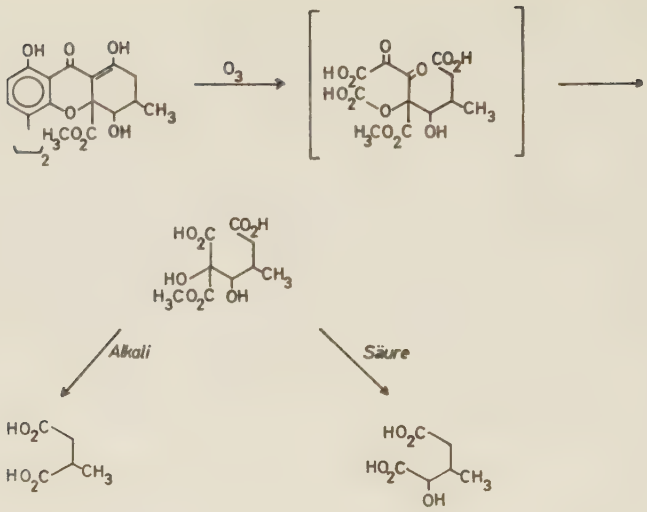


Abb. 18: Reaktionsschema zum Ozonabbau der Secalonsäure A.

Für die Ozonisation von Secalonsäure B stand nur eine geringe Substanzmenge zur Verfügung. Deshalb konnte das dabei entstehende Säuregemisch nicht präparativ aufgetrennt werden. Das Papierchromatogramm zeigte, daß auch aus Secalonsäure B durch Ozonabbau sechs Dicarbonsäuren entstanden waren. Außer Oxalsäure und Methylbernsteinsäure stimmte keine der Säuren in ihrem R_F-Wert mit denen des Secalonsäure A - Abbaues überein. Abb. 19 zeigt, daß sich die Säuregemische, die durch Ozonisierung von Secalonsäure A und B erhalten werden, auch säulenchromatographisch in verschiedene Komponenten auftrennten. Aus Secalonsäure B entstand bei der Ozonisierung keine Säure so bevorzugt, wie es beim Ozonabbau von Secalonsäure A beobachtet worden war.

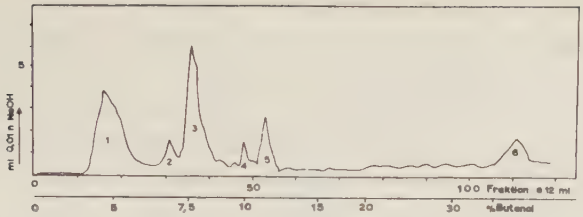
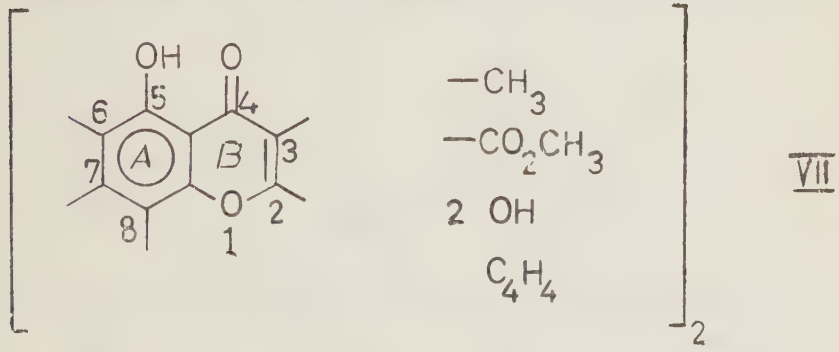


Abb. 19: Auftrennung des Dicarbonsäuregemisches, das beim Ozonabbau von Secalonsäure B erhalten worden war, an Celite.

IV. Zur Konstitution der Secalonsäuren A und B

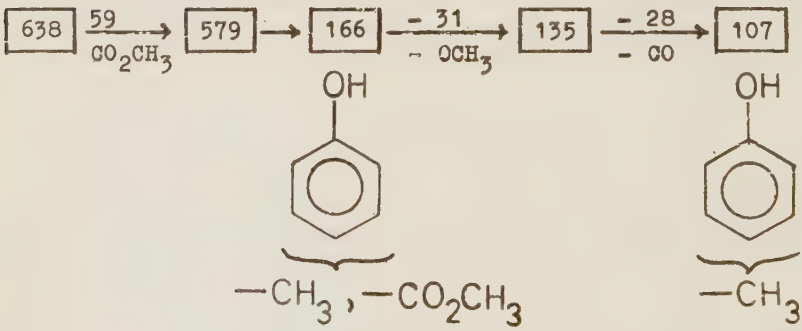
Über das Grundgerüst der Secalonsäure waren bereits von B. FRANCK und Mitarbeiter [7] Untersuchungen angestellt worden. Es hatte sich gezeigt, daß sich der Chromophor der Secalonsäure vom 5,5'-Dihydroxy-8,8'-bichromonyl ableitet [27]. Außerdem enthält der Farbstoff noch vier Hydroxygruppen, sowie zwei C-Methyl- und zwei Carbomethoxygruppen. Danach wurde folgende Teilformel aufgestellt:



VII

Wegen der geringen spektroskopischen Unterschiede können im Bichromonylgerüst auch die C-Atome 2,3 und /oder 2',3' gesättigt vorliegen.

Um Einblick in die Art der Anordnung der Substituenten in der Teilformel (VII) zu bekommen, wurden die Massenspektren der Secalonsäuren A und B aufgenommen. Sowohl für Secalonsäure A als auch für Secalonsäure B ergaben die Spektren ein Molekulargewicht von 638, so daß es sich hierbei wie auch aus der sonstigen Ähnlichkeit der Massenspektren geschlossen werden kann, offensichtlich um Diastereomere handelte (Abb.20/21). Für Secalonsäure B ist der Molekül peak bei 638 wesentlich intensiver als für Secalonsäure A. Somit muß Secalonsäure B stabiler als Secalonsäure A sein. Bei letzterer wird die Carbomethoxygruppe leichter abgespalten. So ist der Peak für M-59 ($-CO_2CH_3$) bei Secalonsäure A im Verhältnis zum Molekülpeak intensiver. Außerdem war aus der Fragmentierung zu ersehen, daß in jeder Molekülhälfte zusätzlich zu den beiden in der Teilformel angegebenen Ringen noch ein weiterer Ring vorhanden sein muß, der je eine Hydroxy-, Carbomethoxy- und Methylgruppe enthält. Dieser Ring wird nämlich beim Elektronenbeschuß während der Aufnahme der Massenspektren unter Aromatisierung als Kresotinsäuremethylester (M=166) abgespalten:



So sind alle wichtigen Fragmente der Massenspektren der Secalonsäuren erklärt.

Die Anordnung der Substituenten im Ring C der Secalonsäure A folgt aus dem Ozonabbau, bei dem α-Hydroxy-ß-methylglutarsäure entsteht.

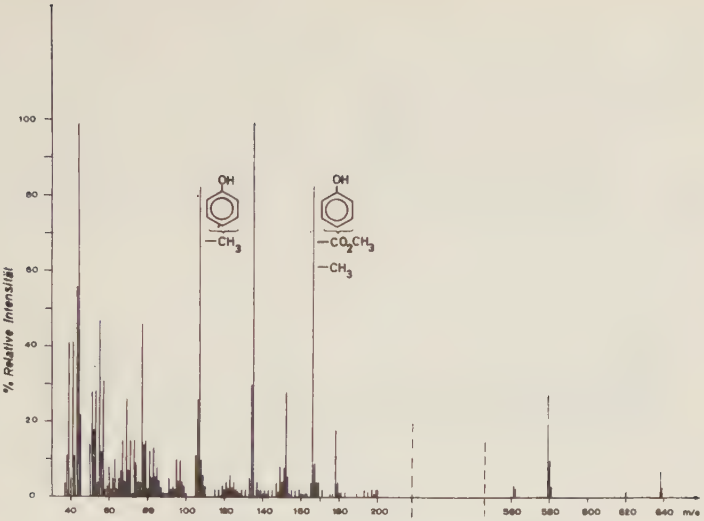
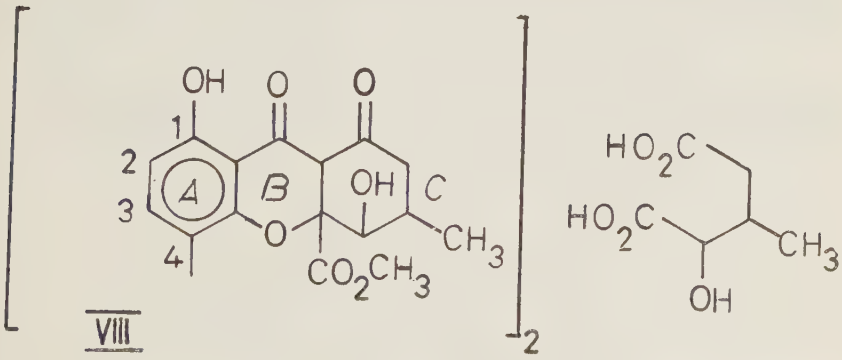


Abb. 20: Massenspektrum der Secalonsäure A.

Aus der angegebenen Teilformel, den Ergebnissen der Massenspektren und des Ozonabbaus von Secalonsäure A kann folgende Konstitution für die Secalonsäure vorgeschlagen werden:



Zu dieser Konstitutionsformel für die Secalonsäure gelangten auch W.B. WHALLEY und Mitarbeiter [17] ausgehend von der Struktur des Ergoflavins (II).

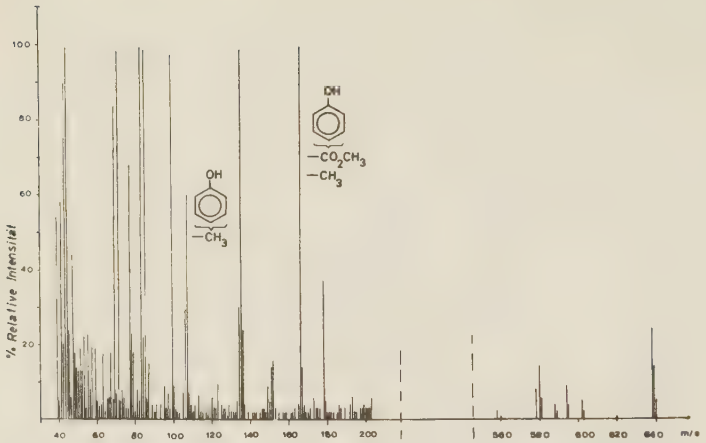
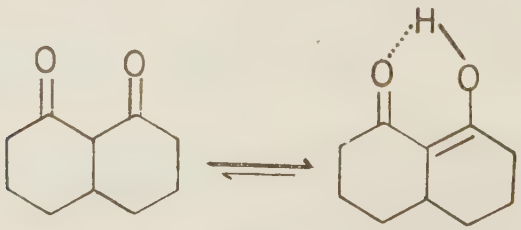


Abb. 21: Massenspektrum der Secalonsäure B.

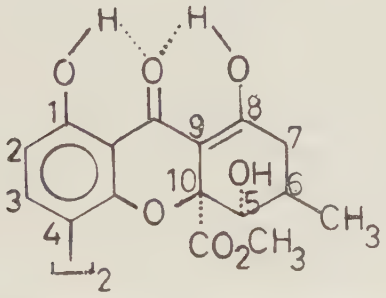
Sie arbeiteten aber mit dem Substanzgemisch der diastereomeren Secalonsäuren und finden genau wie A. STOLL und Mitarbeiter [6] eine Drehwertänderung in Pyridin. Diese führen sie auf Mutarotation am C-9-Atom zurück. Stabile, am C-9epimere Verbindungen kann es aber bei der Secalonsäure nicht geben, weil das ß-Dicarbonylsystem hier zur vinylogen Säure enolisiert ist. Es liegen nämlich solche ß-Dicarbonylverbindungen, bei denen Chelatisierung durch Wasserstoffbrückenbindung möglich ist, in der cis-fixierten Form fast vollständig enolisiert vor. Diese Beobachtung machten H. STETTER und U. MILBERS [28] am Dekalindion (1,8), das nach ihren Untersuchungen praktisch nur in der Enolform vorliegt (IX).



IX

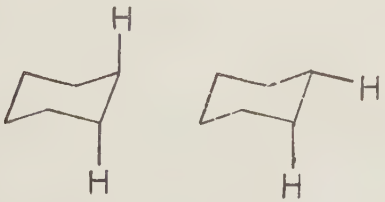
Außerdem müßte das PMR-Spektrum im Falle der Diketoform noch ein weiteres Methinproton zeigen.

Es fragte sich nun, welche Konfigurationen den drei asymmetrischen Kohlenstoffatomen der Secalonsäure A und welche ihrem Diastereomeren Secalonsäure B zuzuordnen waren. Die absolute Konfiguration der drei Asymmetriezentren am C 5, C-6 und C-10 in Secalonsäure A (X) ließ sich nun wie folgt festlegen:



X

Die beim Ozonabbau von Secalonsäure A entstandene Methylbernsteinsäure ist rechtsdrehend und hat die R-Konfiguration. Daraus folgt für das Asymmetriezentrum der C-Methylgruppe (C-6) die in X gezeigte absolute Konfiguration. Das Proton am Carbinolkohlenstoff C-5 im PMR-Spektrum von Secalonsäure A zeigt bei 4,36 ein Dublett mit der Kopplungskonstanten J= 9Hz. So muß dieses transdiaxial zum Methinproton an der C-Methylgruppe stehen, denn diese Kopplungskonstante von etwa 9 Hz wird bei allen Cyclohexanen und Analogen gefunden, in denen zwei transaxiale H-Atome an benachbarten C-Atomen stehen (XI):



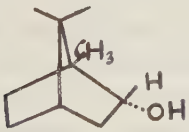
XI XII

Für die Kopplung der Kernspine sterisch anders angeordneter H-Atome (XII) werden kleinere Werte für die Kopplungskonstante von etwa 3 Hz beobachtet [29]. Die Hydroxygruppe am C-5-Atom und die Methylgruppe am C-6-Atom müssen daher trans-diäquatorial angeordnet sein. Dieses Ergebnis wird auch durch das IR-Spektrum von Secalonsäure A gestützt. Es hatte bei 9,55μ(1047/cm) eine Bande, die der C-O-Vibrationsfrequenz von äquatorialen Hydroxygruppen entspricht. Die C-O-Vibrationsfrequenz für axiale Hydroxygruppen würde bei niedrigeren Frequenzen (∿1000/cm) liegen.

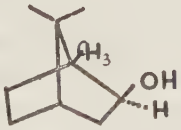
Die Konfiguration der Carbomethoxygruppen ergab sich aus den Unterschieden der beiden Secalonsäuren A und B in ihren Massenspektren und der Rotationsdispersion [30]. Zwischen 436 und 589 mμ zeigen Secalonsäure A und B in Chloroform (Secalonsäure A: -76° → -1193°; Secalonsäure B: + 196° → + 778°) entgegengesetzte Rotationsdispersion. Dies wird immer bei diastereomeren Verbindungen beobachtet, die sich in ihrer Konfiguration an einer Ringverknüpfungsstelle unterscheiden. C. DJERASSI und Mitarbeiter [31] haben die Rotationsdispersion einer großen Anzahl von Steroiden und verwandten Verbindungen gemessen und dabei gefunden, daß Asymmetriezentren an einer Ringverknüpfung, das Vorzeichen des Cottoneffektes bestimmen. Diese Beiträge zur Rotationsdispersion sind hier in erster Näherung unabhängig von der chemischen Natur des Substituenten. Die Asymmetriezentren innerhalb der Ringe wirken sich dagegen in additivem oder subtraktivem Sinne auf den spektropolarimetrischen Verlauf der Kurve aus. So ist die entgegengesetzte Rotationsdispersion der Secalonsäuren A und B dadurch zu erklären, daß die Carbomethoxygruppen an den C-10-Atomen sterisch verschieden angeordnet sind. Aus diesem Grunde sind auch die Peaks bei M-59(CO_2CH_3) in den Massenspektren der Secalonsäuren von unterschiedlicher Intensität. Bei Secalonsäure A hat die Carbomethoxygruppe die weniger stabile cis-quasiaxiale Position zur benachbarten Hydroxygruppe inne und wird daher leichter im Massenspektrometer abgespalten. Die Intensität des Molekülpeaks ist

deshalb im Verhältnis zum Peak bei M minus Carbomethoxygruppe für Secalonsäure A geringer als für Secalonsäure B. Hiernach steht die Carbomethoxygruppe der Secalonsäure A cis zur benachbarten Hydroxygruppe. Somit kann für diesen Mutterkornfarbstoff die in X gezeigte absolute und relative Konfiguration angenommen werden.

Solche unterschiedlichen Intensitäten bei gleichartigem Verlauf der Fragmentierung werden in den Massenspektren der meisten Diastereomeren alicyclischer Verbindungen beobachtet und zur Konfigurationsbestimmung ausgenutzt. So zeigen Borneol und Isoborneol gleiche Molekülpeaks verschiedener Intensität, was ebenfalls auf ungleiche sterische Kompression eines Substituenten (Hydroxygruppe) zurückzuführen ist. Im Borneol (XIII) liegt die stabilere Anordnung vor. Es zeigt deshalb auch einen intensiveren Molekülpeak als Isoborneol [32].



XIII



XIV

Für die Secalonsäure B kann noch keine endgültige Bestimmung der absoluten Konfiguration vorgenommen werden, weil die spezifische Drehung der beim Ozonabbau entstehenden Methylbernsteinsäure und die Konstitution der Abbausäure noch nicht bekannt sind. In der relativen Konfiguration am C-5 und C-6 scheinen aber in Secalonsäure B keine Unterschiede gegenüber Secalonsäure A zu bestehen, weil das PMR-Spektrum von Secalonsäure B bei 4,59 ebenfalls ein Dublett mit einer Kopplungskonstanten von J = 9 Hz zeigt. So können auch in dieser Verbindung die Protonen am C-5 und C-6 nur transdiaxial zueinander stehen.

V. Verhältnis der Secalonsäuren A und B im Mutterkorn.

Da die spezifischen Drehungen der beiden Secalonsäuren A und B nun bekannt waren, konnte die prozentuale Zusammensetzung der nach den in der Literatur beschriebenen Verfahren aus Mutterkorn isolierten Secalonsäure aus dem für diese bestimmten Drehwert ermittelt werden. Die aus deutschem Zuchtmutterkorn isolierte Secalonsäure hatte einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20}$ = +49,5° (Dioxan). Aus den Drehwerten für Secalonsäure A und B (Tabb. 6) errechnet sich eine Zusammensetzung von Secalonsäure A = 52,5 % und von Secalonsäure B = 47,5 %, also ein Verhältnis von etwa 1 : 1. Bei der präparativen Auftrennung der Secalonsäure wurde jedoch Secalonsäure A in größerer Menge als Secalonsäure B gewonnen. Um die Schwankungen des Verhältnisses von Secalonsäure A zu Secalonsäure B in dem Secalonsäuregemisch zu bestimmen, wurde sie aus Mutterkorn verschiedenster Herkunft isoliert. Im deutschen und österreichischen Anbaumutterkorn sowie im spanischen Wildmutterkorn war der Anteil der Komponenten stets gleich. Im kanadischen Mutterkorn betrug die Drehung der isolierten Secalonsäure = 83,5°. Dieser Wert ist fast der für Secalonsäure A ermittelte. Die Untersuchungen der Substanz im Dünnschichtchromatogramm und durch Säulenchromatographie zeigte, daß in diesem Mutterkorn keine Secalonsäure B enthalten war. Auch A. STOLL und Mitarbeiter [6] hatten aus schweizerischem und ungarischem Mutterkorn verschiedene Secalonsäuren isoliert. Nach chromatographischen Untersuchungen, die U. OHNSORGE [30] an diesen uns freundlicher Weise von Herrn Dir. Dr. J. RENZ, Sandoz A.G., Basel, übersandten Präparaten durchführte, enthält die Secalonsäure aus ungarischem Mutterkorn nur die langsam wandernde Komponente Secalonsäure A, während die Chrysergonsäure aus schweizerischem Mutterkorn ein Gemisch beider Secalonsäuren im Verhältnis 3:1 ist.

Die Syntheseleistungen der einzelnen Stämme von Claviceps purpurea sind also durchaus verschieden, so daß die erhaltenen Mutterkornfarbstoffe unterschiedliche Zusammensetzung haben können.

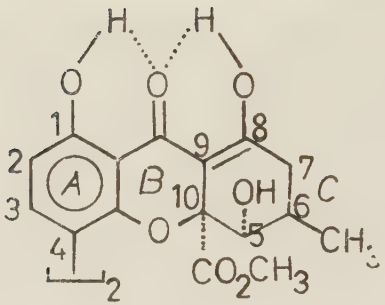
Zusammenfassung

Die seit 1875 beschriebenen Mutterkornfarbstoffe wurden nach den Originalvorschriften isoliert, chromatographisch auf ihre Einheitlichkeit hin untersucht und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß im Mutterkorn orangefarbenes Endocrocin, weinrotes Clavorubin, die gelben Ergochrysinfarbstoffe und hellgelbe Secalonsäure vorhanden waren. Zu den Ergochrysinfarbstoffen gehören Ergoflavin, Ergochrysin B und Ergochrysin C. Das amorphe Ergochrysin C läßt sich weiter in 12 Komponenten auftrennen. Das bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Ergochrysin B ist eine einheitliche Verbindung. Es steht mit seinen chemischen und spektroskopischen Eigenschaften zwischen der Secalonsäure und dem Ergoflavin.

Die bisher als einheitlich angesehene Secalonsäure kann durch Chromatographie an oxalsaurem Kieselgel G in zwei Verbindungen aufgetrennt werden, die nach ihren Massenspektren gleiche Molekulargewichte besitzen und auf Grund ihrer chemischen und spektroskopischen Eigenschaften Diastereomere sind. Sie kommen im Mutterkorn verschiedenster Herkunft in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vor.

Durch oxydativen Abbau der Secalonsäure A mit Ozon entstehen α-Hydroxy-ß-methylglutarsäure und rechtsdrehende Methylbernsteinsäure. Hieraus und aus dem Massenspektrum konnte die Konstitution von Ring C der Secalonsäure bestimmt werden, wonach sich zusammen mit früheren Ergebnissen von B. FRANCK und Mitarbeitern [2,7,27] für beide Secalonsäuren die Konstitution XV ergibt. Auf unabhängigem Wege hatten kurz vorher auch W.B. WHALLEY u.a. [17] die Konstitution des Ringes C nachgewiesen.

Die relative und absolute Konfiguration der drei Asymmetriezentren C-5, C-6 und C-10 wurde aus der R-Konfiguration der Methylbernsteinsäure, aus PMR- und Massenspektren sowie aus der Rotationsdispersion der Secalonsäure A entsprechend Formel XV ermittelt.



XV

Auf Grund ihrer chemischen Konstitution lassen sich die Mutterkornfarbstoffe in zwei Gruppen einteilen: Die Anthrachinonfarbstoffe (Endocrocin, Clavorubin) und die Bixanthonylfarbstoffe (Ergochrysine, Secalonsäure).

Beschreibung der Versuche.

I. Die verwendeten Meßgeräte:

Die angegebenen Schmelzpunkte wurden im Berl-Block bestimmt und korrigiert.

Die UV-Spektren wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer PMQ 20 A, die IR-Spektren mit einem Perkin-Elmer-Spektrographen Modell 21 und einem Perkin-Elmer-Spektrographen Infracord 237 aufgenommen.

Für die Intensitäten der Banden bedeutet:
s = stark, m = mittel, w = schwach. Die Form der Banden wurde durch br = breit und Sch = Schulter charakterisiert.

Die Aufnahme der Protonenresonanzspektren erfolgte mit einem Varian HR-60 PMR-Spektrometer (60 MHz). Die Spektren wurden mit Hilfe der Seitenbandmethode vermessen.

Die Massenspektren wurden von den Atlaswerken in Bremen mit einem Massenspektrometer vom Typ CH 4 aufgenommen. Die Ionisierungsspannung betrug 70 eV, die Beschleunigungsspannung 3 kV. Der Meßbereich des Ionenstromes wurde zwischen 30 Volt und 0,3 Volt variiert, um die Peaks verschiedener Intensität genau auszumessen.

II. Chromatographische Methoden.

a) Ring-Papierchromatogramme (25 cm Durchmesser, Schleicher & Schüll 2043 b). Folgende Elutionsmittel:

1) tert.-Amylalkohol gesättigt mit 0,5 m Phosphatpuffer pH=7 auf Papier, das mit 0,5 m Phosphatpuffer imprägniert war. Das Papier imprägnierte man durch Eintauchen in die Pufferlösung und Abpressen der Flüssigkeit mit Hilfe einer Gummiwalze.
2) n-Butanol/Triäthylamin/Pyridin/Wasser = 4:4:1:6. Das Papier wurde mit 0,5 m Citratpuffer vom p_H=6, wie vorher beschrieben, imprägniert und vor dem Chromatographieren

mit Unterphase frisch besprüht.

3) a) Xylol/Eisessig/Wasser = 10:9:1.
b) n-Butanol/Dibutyläther/Aceton/Wasser/Eisessig = 4:5:9:5:2 [32]
Das Papier wurde jeweils vor dem Chromatographieren mit Unterphase besprüht.

4. n-Propanol/25% Ammoniak (D = 1,9) = 7:3.

5) Für die aufsteigende zweidimensionale Papierchromatographie (Schleicher & Schüll 2043 a gewaschen) wurden Lösungsmittelsysteme nach H. MEFZNER [33] und P. HIRSCH [34] verwendet:
Gegen Faserrichtung: n-Propanol/Ammoniak/Wasser = 6:3:1.
In Faserrichtung: sec. Butanol/Ameisensäure/Wasser = 6:1:2.

6) Für die aufsteigende Dünnschichtchromatographie verwendete man Kieselgel G (E.Merck,Darmstadt). Für die sauren Kieselgel G - Platten wurde das Kieselgel G mit 0,5 n Oxalsäure angerührt und die Platten 60 min bei 110°C im Trockenschrank aktiviert.
Lösungsmittelsysteme: Benzol/Methanol = 19:1
Chloroform/Methyl-n-propylketon =9:1.

b) Säulenchromatographie:

1) Cellulosepulver von Schleicher & Schüll Nr. 123.
2) Neutrales Kieselgel, das auf folgende Weise vorbehandelt war:
Techn. Kieselgel befreite man durch Aufschlämmen in Wasser von feinen körnigen Bestandteilen. Nachdem freies Alkali durch halbkonzentrierte Salzsäure entfernt worden war, wurde das Kieselgel neutral gewaschen und bei 120°C im Trockenschrank aktiviert.
3) Neutrales Kieselgel G (E.Merck, Darmstadt).
Vor dem Chromatographieren wurde das Kieselgel G in Wasser/Methanol = 1:1 aufgeschlämmt, anschließend abgesaugt und im Trockenschrank bei 120 - 130°C bis zum pulvrigen Zerfallen getrocknet.

4) 0,5 n oxalsaures Kieselgel G:
100 g Kieselgel G rührte man mit einer Lösung von 5,3 g Oxalsäure . 2 H_2O in Methanol zu einem dicken Brei und trocknete diesen über Nacht im Trockenschrank bei 60-70°C. Vor dem Gebrauch mußte das Kieselgel G noch eine Stunde bei 110°C im Trockenschrank aktiviert werden.

5) Celite (Johns Manville No. 535).
300 g Celite wurden in einer Säule mit etwa 1 l Äther gewaschen und über Nacht an der Luft getrocknet. Bei 110°C im Trockenschrank aktiviertes Celite war in einer geschlossenen Büchse unbegrenzt haltbar.

c) Sprühmittel für die Chromatographie:

1) Die Zonen der gelben Mutterkornfarbstoffe kuppelten mit einer 5-proz. Lösung von diazotierter Sulfanilsäure in ges. Natriumcarbonatlösung zu orangefarbenen Verbindungen.
2) Die Dicarbonsäuren erschienen als braune Zonen, wenn man die Chromatogramme mit einer frisch bereiteten Lösung von 2 g Glucose und 2 ml Anilin in 20 ml Wasser, 20 ml Methanol und 60 ml n-Butanol besprühte und 10 min bei 115°C im Trockenschrank trocknete [35].

III. Aufarbeitung des Mutterkorns nach G. DRAGENDORFF und V. PODWISSOTZKY [8]

1) Gewinnung von Sclererythrin.

Ein kg feingemahlenes und entfettetes Mutterkorn wurde in 1,5 l 10-proz. Weinsäure und 1 l 96-proz. Äthanol aufgeschlämmt. Nach 36 Stunden wurde das Mutterkorn abzentrifugiert und der dunkelweinrote Extrakt i.Vak. eingedampft. Den in salzsaurem Wasser aufgeschlämmten Rückstand extrahierte man erschöpfend mit Äther. An der Grenzfläche Wasser/Äther schieden sich dunkelbraune Flocken (Sclerojodin) ab. Die bis auf wenige ml eingedampfte ätherische Phase wurde mit der 5 - 6 fachen Menge Petroläther versetzt. Über Nacht schied sich dunkelorangefarbenes Sclererythrin ab. Es wurde abfiltriert und zur weiteren Reinigung wieder in Äther gelöst.

Den Äther schüttelte man mit verd. wässr. Ammoniumcarbonat und zur Neutralisation mit Essigsäure durch. Aus der eingeengten ätherischen Lösung wurdendurch vollständige Fällung mit Petroläther 7 g orangefarbenes Sclererythrin gewonnen.

2) Chromatographische Auftrennung von Sclererythrin.

Eine filtrierte Lösung von 3 g Sclererythrin in 150 ml Oberphase des Systems n-Butanol/0,5 m Phosphatpuffer p_H=7 wurde an einer mit demselben Lösungsmittelsystem bereiteten Cellulosepulversäule (250 g) chromatographiert. Man entwickelte beschleunigt durch Überdruck mit reinem puffergesättigtem Butanol. Nachdem eine gute Trennung von Clavorubin, Endocrocin und den Ergochrysinen erreicht war, stieß man die Säule aus und schnitt die Zonen heraus. Nach dem Aufschlämmen des farbstoffhaltigen Cellulosepulvers in Wasser und dem Ansäuern wurde mit Butanol extrahiert. Dann wurde das Cellulosepulver abgesaugt, die Butanol-Lösungen neutral gewaschen und i.Vak. bis auf einige ml eingedampft. Mit einem Ätherüberschuß wurden die Farbstoffe ausgefällt.

Ausbeute: 210 mg Ergochrysine (7 % bez. auf Sclererythrin)
170 mg Clavorubin (5,6% bez. auf Sclererythrin)
190 mg Endocrocin (6,3% bez. auf Sclererythrin)

3) Abtrennung des Ergoflavins von den Ergochrysinen.

Die Ergochrysine (210 mg) wurden an einer Kieselgel-Säule (2x20 cm, 190 g Kieselgel) chromatographiert. Durch Zusatz von 10-proz. Wasser war das Kieselgel vor Beginn der Chromatographie desaktiviert worden. Die Ergochrysine wurden in Methanol gelöst und im Rotationsverdampfer an das Kieselgel angetrocknet. In wenig Benzol wurde das präparierte Kieselgel auf die Säule gegeben und mit Benzol dem steigende Mengen Aceton hinzugefügt waren, chromatographiert. Bei Zusatz von 5-10 % Aceton ließ sich Ergochrysin B und bei 10-20 % Ergoflavin eluieren. Eine dunkelgelbe Zone blieb am Kopf der Säule haften und konnte auch mit reinem Aceton nicht von der Säule gewaschen werden. Das gelbe Eluat engte man i.Vak. ein.

Aus Äthanol kristallisierten 10 mg gelber Farbstoff aus, der nach UV- und IR-Spektrum, Papierchromatogramm (System 3a) und Schmp. 348-350°C mit Ergoflavin identisch war.

$C_{30}H_{26}O_{14}$ (610,2) Ber. C 59,02 H 4,75
Gef. C 59,02 H 4,29

4) Isolierung von Scleroxanthein und Sclerocristallin.

Nach dem Trocknen des mit Weinsäure und Alkohol behandelten Mutterkorn an der Luft, extrahierte man dieses zehnmal mit je 200 ml Äther. Aus den ersten drei Extrakten kristallisierte beim Eindampfen gelbes Scleroxanthein aus. Es wurde mit kaltem Aceton gewaschen und mehrere Tage lang im Exsikkator getrocknet. Sclerocristallin, das beim Einengen der übrigen Extrakte anfiel, kristallisierte aus Chloroform in gelben Nadeln. Zur Analyse trocknete man diese 8 Std bei 110°C i. Hochvak.

Farbstoff	Analyse	UV-Absorpt.	R_F-Wert	F
Scleroxanthein	Gef. C 60,35 H 4,81	λ max. (ε) = 338 mμ (34700)	System 2 0,7	250-260°C
Sclerocristallin	Gef. C 60,44 H 4,92	λ max. (ε) = 338 mμ (35200)	System 2 0,71	255-260°C

Sclerocristallin und Scleroxanthein unterscheiden sich in ihren chromatographischen und spektroskopischen Eigenschaften nicht und sind daher miteinander identisch.

IV. Die Ergochrysinfarbstoffe.

1) Isolierung der Ergochrysinfarbstoffe [11].

300 g gemahlenes, mit Petroläther entfettetes Mutterkorn wurden mit wasserfreiem Äther erschöpfend extrahiert und die Ätherauszüge i. Vak. zu einem Sirup eingedampft. Daraus wurde das gelbe Farbstoffgemisch mit Petroläther ausgefällt und in

der Hitze mit Ligroin entfettet.
Ausbeute: 850 mg Ergochrysin (0,3% bez. auf Mutterkorn).

2) Chromatographische Auftrennung der Ergochrysine.

Eine filtrierte Lösung von 850 mg Ergochrysin in 25 ml Benzol/5-proz.Methanol chromatographierte man an einer neutralen Kieselgel G-Säule (3,5 x 50 cm, 300 g Kieselgel G). Mit Überdruck zog man die Lösung auf die Säule und entwickelte anschließend mit Benzol/Methanol = 19:1. Nachdem eine gute Trennung der Farbstoffe erreicht war, stieß man die Säule aus und schnitt die Zonen heraus. Nach dem Aufschlämmen des mit Farbstoff durchzogenen Kieselgel G in Wasser wurde der Farbstoff mit Methanol extrahiert und die Lösungen zur Trockene eingedampft. Um Salze zu beseitigen, wurden die Farbstoffe in Chloroform gelöst und die Lösungen durch ein Blaubandfilter filtriert. Nach dem Abdampfen des Chloroforms und dem Trocknen der einzelnen Rückstände über P_2O_5 wurden erhalten:

1,5 mg Ergochrysin B
15,3 mg Ergoflavin
95 mg Ergochrysin C.

Zur weiteren Isolierung von Ergochrysin A, B und C wurde technischer Farbstoff verwendet. Die Säulenchromatographie erfolgte wie oben beschrieben. Aus 60 g technischem Farbstoff erhielt man:
0,03 g Ergochrysin B)(0,05% bez. auf den techn.Farbstoff)
0,360 g Ergoflavin (0,6 % bez. auf den techn.Farbstoff)
5,6 g Ergochrysin C (9,4 % bez. auf den techn.Farbstoff).

3) Charakterisierung von Ergochrysin B.

R_F-Wert (auf oxalsaurem Kieselgel G im System Benzol/Methanol = 19:3) = 0,34.
UV-Spektrum (Methanol): λ max = 371 mμ (ε=6000)
IR-Banden (KBr): 3410 m, 2940 m, 2850 w, 1795 s, 1738 m, 1625 s, 1575 m, 1430 s, 1350 m, 1265 m, 1205 m, 1015 m, 952 m cm^{-1}.

Spezifische Drehung.

$[\alpha]_D^{20} = + 100,2 \pm 0,02^\circ$ (Dioxan $\alpha = + 1,024^\circ$; c =1,02g/100 ml)

Potentiometrische Titration: 11,9 mg Ergochrysin B, in Dimethylformamid/Wasser = 4:1 gelöst, verbrauchten bis zum Wendepunkt 0,185 ml 0,1 n-NaOH, was einem Äquivalentgewicht von 643 und einer freien sauren Gruppe entspricht. pK_{DMF}=10,5. Nach der Titration säuerte man mit 2n Salzsäure an, verdünnte mit Wasser und extrahierte mit Chloroform. Nach dem Verdampfen des Chloroforms wurde unverändertes Ergochrysin B zurückerhalten.

Milde Alkalihydrolyse:

a) Das UV-Spektrum einer bei 20°C aufbewahrten Lösung von 0,905 mg Ergochrysin B in 100 ml n NaOH wurde 5/10/15/21/100/300 Min nach der Zugabe der NaOH gemessen. Es trat nur eine sehr geringe hypsochrome Verschiebung des Maximums von 407 mμ nach 402 mμ ein.

b) Eine Lösung von 15,8 mg Ergochrysin B in n NaOH gelöst ließ man 60 Std stehen. Die gelbe Lösung war während dieser Zeit hellorange geworden. Unter Rühren wurde die Lösung mit 2 n Salzsäure kongosauer gemacht und mit Essigester ausgeschüttelt. Nach dem Neutralwaschen des Extraktes wurde die Lösung bei 20°C im Rotationsverdampfer eingedampft und über konz. H_2SO_4/Ätzkali getrocknet (12,3 mg hellgelbes Pulver). Dieses wurde zur Lactonisierung mit 2 ml Eisessig 40 Min unter Rückfluß gekocht, dann mit Wasser verdünnt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Neutralwaschen der Lösung und Trocknen über Natriumsulfat erhielt man beim Eindampfen 10,8 mg eines gelben Lackes. Im Dünnschichtchromatogramm mit dem Laufmittel Benzol/Methanol = 19:1 wanderte das Lactonisierungsprodukt als eine einheitliche gelbe Zone (R_F= 0,15 - 0,17), die sich mit diazotierter Sulfanilsäure orange anfärbte.

Alkalischmelze nach A. STOLL[6]: Ein Gemisch von 0,5 g KOH, 0,5 g NaOH, 1,5 ml Wasser und 50 mg Ergochrysin B erhitzte man langsam unter ständigem Rühren, wobei sich die Mischung dunkelbraun färbte. Nach 30 Min betrug die Temperatur der Schmelze 200°C, nach weiteren 30 Min wurde sie auf 250°C gesteigert. Nach dem Abkühlen zerrieb man die Schmelze in einem Mörser, nahm sie in Wasser auf und machte die Lösung mit konz. Salzsäure kongosauer. Die braune Lösung wurde mit Kochsalz gesättigt mit Essigester erschöpfend extrahiert. Den Extrakt engte man bis auf 2 ml i.Vak. ein.

Im zweidimensionalen Papierchromatogramm konnten Methylbernsteinsäure (System 5) und 2,2',4,4'-Tetrahydroxybiphenyl (System 3a/3b) nachgewiesen werden. Bernsteinsäure konnte nicht aufgefunden werden.

4) Charakterisierung von Ergochrysin C und Versuche zur Überführung in komponentenärmere Umwandlungsprodukte.

Acetylierung: Eine Lösung von 48,9 mg Ergochrysin C in 2 ml Pyridin versetzte man mit 2 ml Acetanhydrid, wobei die gelbe Lösung fast entfärbt wurde. Nach 48-stündigem Stehen wurde i.Vak. eingedampft und viermal mit Benzol i.Vak. abgedampft. Den Lack löste man in wenig Methanol. Durch Fällen mit Cyclohexan konnten daraus 30,7 mg Ergochrysin C - Acetat - Gemisch erhalten werden. Auf 0,5 n oxalsaurem Kieselgel G im System Benzol/5-proz. Methanol trennte sich dieses in 12 Zonen auf.

Methylierung mit Diazomethan: Zu einer Mischung aus 3 g Ätzkali in 6 ml Wasser, 12 ml Äthanol und 6 ml Äther tropfte bei einer Badtemperatur von 65°C eine Lösung aus 13 g N-Nitroso-N-methyl-p-toluol-sulfamid ("Diazald") in 80 ml Äther so zu, daß die Diazomethanlösung rasch in eine mit Eis/Kochsalz gekühlte Vorlage abdestillierte [36].
40 ml dieser ätherischen Diazomethanlösung gab man zu einer gekühlten Lösung von 54,6 mg Ergochrysin C in 10 ml Dioxan/Äther (1:1), wobei sich nur wenige Bläschen entwickelten. Nach 48-stündigem Stehen bei 2-4°C goß man die Lösung langsam

in 150 ml Wasser, wobei sich Stickstoff entwickelte. Nach Beendigung der Gasentwicklung extrahierte man zweimal mit Chloroform, wusch den Extrakt mehrere Male mit Wasser und dampfte diesen nach dem Trocknen über Natriumsulfat i.Vak. ein. Es wurden 35,8 mg hellgelber Rückstand erhalten, der sich im Dünnschichtchromatogramm an oxalsaurem Kieselgel G im System Benzol/Methanol = 19:1 in 10 Farbstoffzonen von größeren R_F-Werten als die des Ausgangsmaterials auftrennte.

Alkalischmelze nach A. STOLL [6]: 500 mg Ergochrysin C, 1,5 g KOH, 1,5 g NaOH und 3 ml Wasser wurden 30 Min lang auf 200°C und 30 Min lang auf 250°C erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie beim Ergochrysin B beschrieben.

Hydrolyse mit n Natronlauge: Eine Lösung von 132,2 mg Ergochrysin C in 25 ml n NaOH wurde 48 Std bei 18°C stehengelassen, danach mit 2 n Salzsäure kongosauer gemacht und mit Essigester ausgeschüttelt. Nach dem Neutralwaschen und Trocknen des Extraktes über Natriumsulfat wurde i.Vak. eingedampft. Es blieben 70,4 mg einer dunkelgelben Substanz zurück, die sich im Dünnschichtchromatogramm an oxalsaurem Kieselgel G im System Chloroform/20-proz. Aceton in 15 Farbstoffzonen auftrennte.

V. Isolierung von Ergoxanthein [18], Secalonsäure [6] und Chrysergonsäure [6].

Ergoxanthein: Zur Herstellung des sogenannten "Fluidextraktes" wurden 100 g Mutterkorn in einer Mischung aus 2 ml 36-proz. Essigsäure und 98 ml Wasser aufgeschlämmt. Nach 3-tägigem Stehen gab man 50 ml Äthanol zu und saugte 12 Std. danach das Mutterkorn ab. Mit zweimal je 50 ml Äthanol wurde es nachgewaschen. Man erhielt so 160 ml eines "Fluidextraktes", der i.Vak. auf wenige ml eingedampft wurde. Den Rückstand nahm man in 50 ml Wasser auf und filtrierte den entstandenen Niederschlag ab. Dieser wurde mit Wasser ausgewaschen. Die wässerige, schwachsaure Lösung wurde mit Chloroform und Äther extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat und getrenntem

Eindampfen der Extrakte i.Vak. erhielt man aus beiden Lösungen je 200 mg orangefarbenes Ergoxanthein (0,2 % bez. auf Mutterkorn). Im Papierchromatogramm (System 1,2,3a) waren beide Farbstofffraktionen miteinander identisch und enthielten: Clavorubin, Endocrocin, die Ergochrysine und Secalonsäure.

Secalonsäure: 250 g feingemahlenes und mit Petroläther entfettetes Mutterkorn wurde dreimal mit je 1 l Chloroform auf 60°C erwärmt. Der nach dem Eindampfen der Extrakte verbleibende Rückstand wurde in 500 ml Petroläther aufgenommen, wobei ein hellgraues Pulver ausfiel. Zur Entfernung der Alkaloide wusch man dieses solange mit Eisessig, bis ein nunmehr gelbes Pulver zurückblieb, das mit Methanol ausgekocht wurde. Nach dem Abkühlen der Lösung saugte man den gelben Farbstoff ab. Aus Aceton kristallisierte die Secalonsäure in gelben Nadeln (Schmelzpunkt: 256-258°C). Ausbeute: 400 mg (0,16% bez. auf Mutterkorn).

Chrysergonsäure: 250 g entfettetes und gemahlenes Mutterkorn wurde bei Zimmertemperatur dreimal mit je 1 l 80-proz. Methanol extrahiert. Die vereinigten Methanolauszüge dampfte man i.Vak. auf 500 ml ein, säuerte den wässerigen Rückstand mit 2 n Salzsäure an und extrahierte dreimal mit je 300 ml Äther. Die dabei als Zwischenschicht auftretende feinkörnige graue Fällung enthielt die Chrysergonsäure. Aus dem weinroten Ätherextrakt schieden sich nach längerem Stehen noch weitere Mengen der Chrysergonsäure ab. Sie wurde abgesaugt und nacheinander mit heißem Äther und Methanol gewaschen. Nach dem Umkristallisieren aus Dioxan/Äther (1:4) erhielt man 222 mg Chrysergonsäure, die bei 255-260°C schmolzen. (0,09 % bez. auf Mutterkorn).

VI. Saure Extraktion des Mutterkorns.

Je 100 g Mutterkorn wurden

1) mit 200 ml 2n Salzsäure und 200 ml n-Butanol 8 Std. lang im Wasserbad auf 80°C erwärmt.

2) mit 200 ml 2n Salzsäure 30 Min. lang erhitzt. Nach dem Abkühlen setzte man 200 ml n-Butanol hinzu.
3) mit 200 ml 2n Salzsäure und 200 ml Aceton 1,5 Std. lang im Wasserbad unter Rückfluß gekocht.
4) mit 100 ml 6n Salzsäure und 100 ml n-Butanol 30 Min. lang im Wasserbad auf 75°C erwärmt.
5) mit 200 ml Eisessig 30 Min. lang unter Rückfluß gekocht.
6) mit 200 ml Dioxan, das 2,5 Mol Salzsäure enthielt, 30 Min. lang unter Rückfluß gekocht.

Die Extrakte aller Ansätze wurden nach Zugabe von je 100 ml Wasser erschöpfend mit Butanol ausgeschüttelt. Die Butanolextrakte enthielten nach den Papierchromatogrammen (System 1, 2, 3a) Endocrocin, Clavorubin und die Ergochrysine.

VII. Charakterisierung der Secalonsäuren A und B.

1) Präparative Gewinnung von Secalonsäure aus dem Mutterkorn.
Zu 5,5 kg zerkleinertem und entfettetem Mutterkorn, die in 15 l 10-proz. Weinsäure angeschlämmt worden waren, wurden nach 24 Std. 6 l Methanol gegeben. Nach 12 Std. zentrifugierte man das Mutterkorn ab und wusch es mit 35 l Methanol nach. Nachdem das Mutterkorn an der Luft getrocknet worden war, wurde es in 500 g-Portionen dreimal mit je 1,5 l Chloroform 8 Std. im Wasserbad unter Rückfluß gekocht. Noch heiß wurde das Mutterkorn abgesaugt und der Extrakt (ca. 36 l) i. Vak. eingedampft. Als Rückstand hinterblieben 1,5 l dunkelbraunes Öl, das in 10 l Petroläther aufgenommen wurde. Die Secalonsäure (25,2 g) fiel dabei als braungelbes Pulver aus. Zur Beseitigung der anhaftenden Alkaloide wurde das Pulver dreimal mit 30 ml Eisessig aufgeschlämmt, abgesaugt und über Schwefelsäure/Ätzkali getrocknet. Nach dem Umkristallisieren aus Chloroform erhielt man 9,2 g Secalonsäure (0,17% bez. auf Mutterkorn).

2) Chromatographische Auftrennung der Secalonsäure.
Eine Lösung von 600 ml Secalonsäure in 200 ml Chloroform/

Methyl-n-propylketon 4:1 chromatographierte man an 300 g oxalsaurem Kieselgel G im Lösungsmittelsystem Chloroform/ Methyl-n-propylketon. Das Eluat wurde in 30 - 40 ml Proben mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen prüfte man mit Hilfe des Dünnschichtchromatogramms. Die Fraktionen, welche reine Farbstoffe enthielten, wurden zusammengefßt, mit Wasser neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels blieben Secalonsäure A und B als hellgelbes bzw. zitronengelbes Pulver zurück. Aus Chloroform erhielt man Secalonsäure B in würfelförmigen, zitronengelben Kristallen und Secalonsäure A in schwachgelben Plättchen.

Ausbeute: 264,8 mg Secalonsäure A (44 % bez. auf Secalonsäure)
84,7 mg Secalonsäure B (14 % bez. auf Secalonsäure).

Zur Analyse wurden beide Farbstoffe dreimal aus Chloroform umkristallisiert und 8 Std. lang bei 110°C i.Hochvak. getrocknet.

3) Chemische und physikalische Eigenschaften der Komponenten Secalonsäure A und Secalonsäure B.

Spezifische Drehung:

Secalonsäure A $[\alpha]_D^{20} = -\ 83{,}8^\circ \pm 0{,}3^\circ$ (Dioxan; Mittelwert aus 4 Versuchen)

$[\alpha]_D^{20} = -\ 176{,}8^\circ \pm 0{,}5^\circ$ (Pyridin; $\alpha = -\ 0{,}98^\circ$; c = 0,555 g/100 ml)

Secalonsäure B $[\alpha]_D^{20} = +\ 195{,}8^\circ \pm 0{,}7^\circ$ (Dioxan; Mittelwert aus 3 Versuchen)

$[\alpha]_D^{20} = +\ 194{,}4^\circ \pm 0{,}2^\circ$ (Pyridin; $\alpha = +\ 0{,}84^\circ$; c = 0,432 g/100 ml)

Potentiometrische Titration: Die Durchführung der potentiometrischen Titration erfolgte wie beim Ergochrysin B beschrieben. 13,462 mg (14,95 mg) Secalonsäure A verbrauchten 0,39 (0,433) ml 0,104 n Natronlauge, entsprechend einem Äquivalentgewicht von 330 (331) oder zwei freien sauren Gruppen. $pK_{DMF} = 8{,}65$ (8,7).

14,442 mg (23,37 mg) Secalonsäure B verbrauchten 0,41 (0,67) ml 0,104 n Natronlauge, entsprechend einem Äquivalentgewicht

von 339 (338) oder 2 freien sauren Gruppen. pK_{DMF} = 9,05 (8,95).

Alkaliabbau nach A. STOLL [6]: 450 mg Secalonsäure B (300 mg Secalonsäure A), 1 g (0,75 g) KOH, 1 g (0,75 g) NaOH und 1 ml (0,5 ml) Wasser wurden 30 Min. lang auf 200°C und 30 Min. lang auf 250°C erhitzt. Die Aufarbeitung erfolgte wie beim Ergochrysin C beschrieben.
Die zweidimensionale Papierchromatographie zeigte als Abbauprodukte 2,2',4,4'-Tetrahydroxy-biphenyl (System 3a/3b) und Methylbernsteinsäure sowie Bernsteinsäure (System 5).

UV-Spektren (Dioxan):

Secalonsäure A λ_{max} = 338 mμ (ε=41023) c=1,172 mg/100 ml; E = 0,752

Secalonsäure B λ_{max} = 339 mμ (ε=40221) c=1,210 mg/100 ml; E = 0,744

IR-Spektren (KBr.):

Secalonsäure A 3440 m, 2950 w, 1733 s, 1610 ss, 1587 m, 1544 m, 1429 m, 1325 m, 1235 s , 1154 w, 1146 w, 1064 s, 1045 , 1025 w , 990 w, 890 w, 858 w, 813 m cm^{-1}.

Secalonsäure B 3540 w, 2960 w, 1738 s, 1600 ss, 1583 s, 1432 s, 1351 w, 1324 m, 1258 s, 1235 w, 1190 w, 1138 w, 1105 w, 1087 m, 1047 m, 1026 w, 1004 m, 980 m, 952 w, 929 w, 900 w, 884 w, 824 m, 813 w, 753 m, 730 m cm^{-1}.

Acetylierung von Secalonsäure A: Zu einer Lösung von 46,7 mg Secalonsäure A in 2 ml Pyridin gab man 2 ml Acetanhydrid. Nach 48 Std. dampfte man die Lösung i. Vak. ein und dampfte viermal mit Benzol ab. Der Lack wurde in Methanol aufgenommen; beim Zusatz von Cyclohexan fielen 52,1 mg farbloses Secalon-A-Acetat aus. Die Auftrennung des Secalon-A - Acetates im Dünnschichtchromatogramm (Maßstab 1:2) mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol = 9:1 war in Abb. 10 gezeigt worden. Das Secalon-A-Acetat gab keine rote Eisen-III-chlorid-Reaktion.

Schon durch Spuren von Feuchtigkeit wurde es aber verseift und zeigte mit Eisen-III-chlorid wieder eine rote Färbung.

Methylierung von Secalonsäure A: Eine Lösung von 55,7 mg Secalonsäure A in 5 ml Dioxan versetzte man mit 20 ml einer ätherischen Diazomethanlösung, wobei eine schwache Stickstoffentwicklung auftrat. Nach 36-stünd. Stehen bei 10°C wurde das überschüssige Diazomethan mit Wasser zersetzt und die Lösung mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Eindampfen erhielt man 68,2 mg gelbes Methylierungsprodukt. Dieses trennte sich im Dünnschichtchromatogramm (Maßstab 1:2) im Lösungsmittelsystem Benzol/Methanol = 17:3 in 6 Zonen auf (Abb.10), die nicht näher untersucht wurden.

VIII. Oxydativer Abbau der Secalonsäuren A und B.

1) Ozonisierung von Secalonsäure A

600 mg Secalonsäure A in 100 ml Essigester gelöst, behandelte man 15 Std. lang bei 0°C mit 7-proz. Ozon in Sauerstoff bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 320 ml/Min. Die Lösung wurde nach Zugabe von 1 ml Perhydrol und 1 ml Ameisensäure 12 Std. lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dann mehrmals unter Zugabe von Wasser und festem Natriumsulfit im Rotationsverdampfer zu einem dunklen Sirup eingedampft. Der in wenig Wasser aufgenommene Rückstand wurde im Kutscher-Steudel-Apparat mit Äther extrahiert. Die Ätherauszüge ergaben nach dem Eindampfen ein dunkelbraunes Öl, das sich im Papierchromatogramm (System 4) in 6 Dicarbonsäuren auftrennte. R_F-Werte: 0,00 - 0,18 (Oxalsäure) 0,37 (Methylbernsteinsäure) und 0,25, 0,44, 0,54, 0,57. Bernsteinsäure war nicht nachzuweisen.

2) Auftrennung des Dicarbonsäuregemisches an Celite

60 g Celite wurden mit 24 ml 0,2 n Schwefelsäure sorgfältig in einem Mörser verrieben, das Pulver in 500 ml Chloroform (gesättigt mit 0,2 n Schwefelsäure) aufgeschlämmt und portionsweise in eine Säule gegossen (Ø = 2,5 cm). Jede Portion

mußte gleichmäßig festgestampft werden, damit keine Luftblasen in der Säule entstehen konnten. Als das Chloroform nur noch 2 cm hoch über der Säule stand, schlämmte man das Dicarbonsäuregemisch in 1 g präpariertem Celite und 25 ml Chloroform auf, schüttete es vorsichtig auf die Säule und entfernte mit Watte die Reste der Substanz von der Säulenwand. Die Watte wurde fest auf die Oberfläche der Säule gedrückt. Die zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittel sättigte man mit 0,2 n Schwefelsäure und gab sie zur Entfernung der Wassertropfen durch ein trockenes Filter.

Die Entwicklung der Säule erfolgte durch Zugabe von 100 ml Chloroform-Portionen, denen 5/10/15/20/25/30/35/40 und 60% n-Butanol zugesetzt waren. Das Eluat wurde im Fraktionssammler in 12 ml-Proben aufgefangen. Nach Zusatz von 5 ml CO_2-freiem Wasser und 1-2 Tropfen Phenolrot wurde jede Probe gegen 0,01 n Natronlauge titriert. Vor und während der Titration leitete man Stickstoff durch die Proben. Der Anteil der Säuren im Gemisch wurde aus der Menge der verbrauchten Natronlauge berechnet:

1	8,47 ml	= 3,4 %	(Chloroform)	R_F = 0,54
2	171,75 ml	= 68,0 %	(Chloroform/ 5% Butanol	R_F = 0,57
3	8,8 ml	= 3,5 %	(Chloroform/10% Butanol	R_F = 0,44
4	45,7 ml	= 18 %	(Chloroform/10% Butanol	R_F = 0,37
5	6,0 ml	= 2,5 %	(Chloroform/20% Butanol	R_F = 0,25
6	10,0 ml	= 4 %	(Chloroform/35% Butanol	R_F = 0,00-0,18

Alle angegebenen R_F-Werte beziehen sich auf System 4.

Da die Säure 2 sich nicht unzersetzt isolieren ließ, sollte sie durch Abbau mit Schwefelsäure oder Natronlauge in eine stabilere Form überführt werden.

Behandlung der Abbau-Säure 2:

a) mit Schwefelsäure

Eine Lösung von 2 mg der Abbau-Säure 2 in 10 ml 0,2 n Schwefelsäure wurde 5 Std. lang unter Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung extrahierte man mit Essigester. Zur Entfernung der Schwefelsäure wurde anschließend

mit Bariumcarbonat durchgeschüttelt. Der Essigester enthielt nur eine Säure (R_F-Wert: 0,44, System 4).

b) mit Natronlauge

2 mg der Abbau-Säure 2 wurden in 10 ml 0,1 n Natronlauge gelöst und 5 Std. erhitzt. Nach dem Ansäuern mit 2 n Salzsäure und Ausschütteln mit Essigester erhielt man als Abbau-Säure Methylbernsteinsäure (R_F-Wert 0,37, System 4) und Oxalsäure (R_F-Wert 0,00 - 0,18).

3) Isolierung der Abbau-Säuren 2 und 4.

Zur Isolierung der beiden Säuren wurden zweimal 2 g Secalonsäure A in je 300 ml Essigester gelöst und nacheinander bei 0°C mit einem 7-proz. Ozon-Strom in Sauerstoff bei einer Strömungsgeschwindigkeit von 300 ml/Min. bis zur Blaufärbung der Lösung behandelt. Nach dem Zersetzen der Ozonide wurde das dunkle Öl 5 Std. mit 50 ml 0,2 n Schwefelsäure erhitzt, die Lösung dann mit Aktivkohle behandelt und heiß filtriert. Nach dem Abkühlen extrahierte man die saure Lösung erschöpfend mit Essigester und schüttelte sie zur Beseitigung der Schwefelsäure mit wenig festem Bariumcarbonat durch. Eindampfen des Essigesterauszuges ergab 600 mg eines hellbraunen Öls, das an 3 Celitesäulen (2,5 x 32 cm), wie schon beschrieben, aufgetrennt wurde. Die einzelnen Fraktionen prüfte man im Papierchromatogramm und faßte diejenigen, welche Zonen mit gleichen R_F-Werten enthielten, zusammen. Diese wurden neutral gewaschen und i. Vak. eingedampft. Man erhielt 20 mg Abbau-Säure 2 als gelbliches Öl und 130 mg Methylbernsteinsäure als graue Substanz.

4) Charakterisierung der Abbau-Säuren 2 und 4.

a) Eine Lösung von 20 mg der öligen Abbau-Säure 2 in 50 ml heißem Wasser wurde mit Aktivkohle behandelt und nach dem Abkühlen mit 0,1 n Natronlauge auf p_H = 8,5 gebracht. Aus der im Rotationsverdampfer bis auf wenige ml eingedampfte Lösung fällte man mit Äthanol 24,3 mg des Natriumsalzes der Dicarbonsäure; es war stark hygroskopisch. Vor der

Analyse trocknete man die Substanz 8 Std. i. Hochvak. bei 110°C.

Ber. für Dinatriumsalze von Hydroxy-dicarbonsäuren mit
5 C-Atomen ($C_5H_6O_5$) : C 31,25 H 3,13
6 C-Atomen ($C_6H_8O_5$) : C 34,94 H 3,88
7 C-Atomen ($C_7H_{10}O_5$): C 38,18 H 4,54

Gef. für das Dinatriumsalz der Abbau-Säure 2
: C 35,88 H 3,67

Test auf α-Hydroxysäuren [23]: 2 ml 10-proz. Silbernitratlösung wurden mit 2 ml konz. Salpetersäure und 25 ml 2-proz. Kaliumperjodatlösung versetzt. Ein Tropfen von diesem Reagenz und einen Tropfen der in Wasser gelösten Säure miteinander vermischt ergaben nach kurzer Zeit einen weißen Niederschlag. Ebenso reagierte Äpfelsäure, Ascorbinsäure und Milchsäure mit diesem Reagenz, während sich bei ß-Hydroxypropionsäure, Brenztraubensäure und Fumarsäure kein Niederschlag bildete.

IR-Spektrum des Natriumsalzes(KBr.): 3450 br., 2964 w, 1700 w, 1639 s, 1575 s, 1408 s, 1388 m, 1055 w cm^{-1}.

b) Durch Sublimation i. Hochvak. bei 90 - 100°C wurde die isolierte Methylbernsteinsäure gereinigt. Im zweidimensionalen Papierchromatogramm (System 5) hatte die isolierte Säure den gleichen R_F-Wert wie synthetische Methylbernsteinsäure. Schmelzpunkt: 105-106°C. Der gleiche Wert wurde von L.A.DUNCANSON [24] für die d-Form der Methylbernsteinsäure angegeben.

spezifische Drehung

Für die spezifische Drehung der Methylbernsteinsäure wurde ein Wert von $[\alpha]_D^{20} = \pm 9 - 10^\circ$ (Methanol) angegeben [48]. $[\alpha]_D^{\infty} = +10,9^\circ \pm 0,2^\circ$ (Methanol $\alpha = 0,12^\circ$; $c = 1,017$ g/100 ml)

Analysenwerte:

$C_5H_8O_4$ (132,1)	Ber.	C 45,45	H 6,06
	Gef.	C 45,31	H 6,15

5) Ozonisierung von Secalonsäure B.

Eine Lösung von 300 mg Secalonsäure B in 250 ml Essigester wurde wie bei Secalonsäure A beschrieben mit O$_3$ behandelt. Die Auftrennung des Dicarbonsäuregemisches erfolgte ebenfalls an Celite. Der Anteil der Säuren im Gemisch wurde aus der Menge der verbrauchten Natronlauge berechnet:

1	25,7 ml	=	33,1 % (Chloroform/ 5% Butanol)
2	4,6 ml	=	6,0 % (Chloroform/ 5% Butanol)
3	26,3 ml	=	34,5 % (Chloroform/7,5% Butanol)
4	3,6 ml	=	4,7 % (Chloroform/10% Butanol)
5	7,8 ml	=	10,2 % (Chloroform/10% Butanol)
6	8,1 ml	=	10,6 % (Chloroform/40% Butanol)

Nur die Dicarbonsäuren der Fraktion 4 (System 4; R_F = 0,37) und 6 (System 4; R_F = 0,00 - 0,18) haben den gleichen R_F-Wert wie die in den entsprechenden Fraktionen von Secalonsäure A.

IX. Secalonsäure A / Secalonsäure B - Verhältnis in der Secalonsäure, die aus Mutterkorn verschiedener Herkunft isoliert wurde.

Von jeder Mutterkornsorte standen zur Isolierung von Secalonsäure 100 g zur Verfügung. In Tab. 7 werden die Ausbeuten an Gesamtsäure und das Verhältnis von Secalonsäure A zu Secalonsäure B miteinander verglichen:

Tab. 7:

Mutterkorn	Gesamtsäure	Secalonsäure A	Secalonsäure B
Oesterreich (Anbau MK)	115,6 mg	48,4 mg	48,9 mg
Spanien (Wild MK)	55,5 mg	21,2 mg	21,0 mg
Deutschland (Anbau MK)	85,0 mg	37,5 mg	52,9 mg +)
Kanada (Wild MK)	103,8 mg	103,8 mg	-

+) Secalonsäure B war stark durch roten Farbstoff verunreinigt.

LITERATURVERZEICHNIS

1) H.G. Boit — Ergebnisse der Alkaloidchemie bis 1960, Akademie Verlag Berlin 1961.

2) B. Franck, T. Reschke — Angew.Chem. 71, 407 (1959).
B. Franck — Chem.Ber. 93, 347 (1960).
Planta Medica 8, 420 (1960).

3) Y. Asahina, F. Fuzikawa — Ber. dtsch.chem.Ges. 68, 1558 (1935).

4) J.W. ApSimon, J.A. Corran, N.G. Creasy, K.Y. Sim, W.B. Whalley — Proc. chem. Soc.(London) 1963, 209.

5) F. Kraft — Arch.Pharmazie 244, 344 (1906).

6) A. Stoll, J. Renz, A. Brack — Helv.chim.Acta 35, 2022 (1952).

7) B. Franck, O.W. Thiele, T. Reschke — Chem.Ber. 95, 1328 (1962).

8) G. Dragendorff, V. Podwissotzky — Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol.Pharmak. 6, 172 (1877).

9) I. Zimmer — Diplomarbeit Göttingen 1964.

10) A. Freeborn — Pharmac. J. 1912, 568.

11) G. Jacoby — Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Pathol.Pharmak. 39, 85 (1897).

12)	G. Barger	Ergot und Ergotism London 1931, 140.
13)	W. Bergmann	Ber.dtsch.chem.Ges. 65, 1489 (1932).
14)	A.W. Forst	Arch.exp. Path.Pharm. 114, 129 (1926).
15)	G.Elington F. E. King G. Lloyd I.W. Loder J.R. Marshall A. Robertson W.B. Whalley	J. chem. Soc.(London) 1958, 1833.
16)	J. Ahrens	Diplomarbeit Göttingen 1962.
17)	J.W. ApSimon A.J. Corran N.G. Creasy W. Marlow W.B. Whalley K.J. Sim	Proc. chem. Soc. (London) 1963, 313.
18)	W.T. Wenzell	Amer.J. Pharmacy 82, 410 (1910.
19)	W.T. Wenzell	Handbuch der prakt. u. wissen- schaftl. Pharmazie 6, 782.
20)	F.E. King T.J. King L. C. Manning	J. chem. Soc. (London) 1957, 563.
	H.D. Gibbs	J. Biol. Chemistry 73, 649 (1927).

21) R.K. Lemieux
R.K. Kullnig
H.J. Bernstein
W.G. Schneider
J.Amer.chem. Soc. 80, 6098 (1958).

22) M.H. Perterson
H.M. Johnson
J. Biol. Chem. 174, 775 (1948).

H.J. Strecker
Dissertation Western Reserve University 1950.

23) C.K. Ingold
J.chem. Soc. (London) 121, 2686 (1922).

24) F. Feigl
Spot Test in Organic Analysis S. 127.

25) L.A. Duncanson
J.chem.Soc. (London) 1952, 1754.

26) W. Klyne
Progress in Stereochemistry S. 188, 202-3, Butterworthy Scientif. Publ. London 1954.

27) B. Franck
G. Baumann
Chem. Ber. 96, 3209 (1963).

28) H. Stetter
U. Milbers
Chem. Ber. 91, 977 (1958).

29) W.G. Schneider
J.A. Pople
J. Bernstein
High Resolution Nuclear Magnetic Resonance S. 392 ff; McGraw-Hill Book Comp.Inc., New York 1959.

30) U. Ohnsorge
Diplomarbeit Kiel 1964.

31) C. Djerassi
Optical Rotatory Dispersion S.64; McGraw-Hill Book Comp.Inc. New York 1960.

H.S. Leemann
S. Rabbri
Helv.chim.Acta 42, 2696 (1959).

32) K. Biemann — Mass Spectrometry S. 144 ff; McGraw-Hill Book Comp.Inc., New York 1962.

33) H. Metzner — Naturwiss. 49, 183 (1962).

34) P. Hirsch — Arch. Mikrobiol. 46, 53 (1963).

35) F.A. Isherwood, C.S. Hanes — Biochem. J. 55, 824 (1953).

36) Th. De Boer, H.J. Backer — Org. Synth. 36, 16 (1956).

37) E. Hardegger — Helv. chim. Acta 44, 1413 (1961).

H. Braunschweiger — Helv. chim. Acta 44, 1125 (1961).

Lebenslauf

Am 6. 11. 1935 wurde ich, Ellen-Marie Gottschalk, geb. Hrabowski, in Göttingen als Tochter des Fabrikdirektors Dipl. Ing. Max Hrabowski und seiner Ehefrau Ilse, geb. Stumpf geboren.

In Salzwedel/Altm. besuchte ich die Volksschule und die Oberschule für Jungen und Mädchen, an der ich im Juni 1953 meine Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester begann ich mit dem Chemiestudium an der Humboldt-Universität in Berlin. Im Frühjahr 1957 bestand ich dort das Diplomvorexamen in Chemie. 1957/58 mußte ich meine Ausbildung ein Jahr lang unterbrechen.

Meine Diplomarbeit "Untersuchungen über den Lackmusfarbstoff" fertigte ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Musso im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen vom Dezember 1959 bis zum Januar 1961 an. Im Mai 1961 bestand ich das Diplomchemiker-Hauptexamen und arbeitete seitdem unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Franck an der vorliegenden Dissertation "Zur Systematik und Struktur der Mutterkornfarbstoffe".

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren: BRÖCKMANN, K. DIMROTH, FRANCK, GRELL, HAVEMANN, JOST, KLEBER, R. MEYER, MUSSO, NEUNHÖFFER, RIENÄCKER, RITSCHL, SCHLEGEL und THILO.

Frau Dipl.phys. M.L. Ahrens möchte ich für die Messung der Protonen-Resonanzspektren danken.
Ebenfalls danke ich Frau S. Ohage, Frl. W. Heymer und Herrn Dr. M. Springorum für die Messungen von UV- und IR-Spektren, sowie Frl. Chr. Gaaz für experimentelle Mitarbeit bei den abschließenden Versuchen und Herrn Dr. O. Pfund für die sorgfältigen Mikroanalysen.